



# Buněčná migrace na vláknenných materiálech

## Bakalářská práce

*Studijní program:* B3107 – Textil  
*Studijní obor:* 3107R007 – Textilní marketing  
*Autor práce:* **Andrea Šamanová**  
*Vedoucí práce:* Mgr. Kateřina Strnadová





# Migration of the cells on the fibrous scaffolds

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3107 – Textil  
*Study branch:* 3107R007 – Textile marketing - textile marketing  
*Author:* **Andrea Šamanová**  
*Supervisor:* Mgr. Kateřina Strnadová



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Andrea Šamanová  
Osobní číslo: T11000602  
Studijní program: B3107 Textil  
Studijní obor: Textilní marketing  
Název tématu: Buněčná migrace na vlákenných materiálech  
Zadávací katedra: Katedra hodnocení textilií

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava scaffoldu
3. Testování scaffoldu
4. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. FRESHNEY R. I. Culture of animal cells. 2010, ISBN 9780470528129.
2. YARROW, J., C., PERLMAN, Z., E., WESTWOOD, N., J., MITCHISON, T., J. (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. BMC Biotechnology, 4 (21)
3. LIANG, CH., PARK, A., Y., GUAN, J. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature Protocols, 2 (2), p. 329 333.
4. RIAHI, R., YANG, Y., ZHANG, D., D., WONG, P., K. (2012). Advances in wound healing assay for probing collective cell migration. Journal of Laboratory Automation. 17 (1), p. 59 65.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Kateřina Pilařová

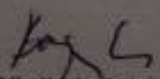
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: 24. října 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: 14. května 2015

  
Ing. Jana Drašarová, Ph.D.  
děkanka



  
doc. Ing. Vladimír Bajžik, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 30. ledna 2015

Technická univerzita v Liberci

Fakulta textilní

Katedra hodnocení textilií

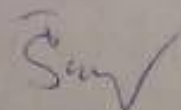
V Liberci dne 19. 5. 2015

Žádám o změnu termínu odevzdání bakalářské práce z května 2015 na leden 2016.

Důvod odkladu odevzdání: Nesplnění studijních povinností.

Děkuji za vyřízení.

Andrea Šamanová

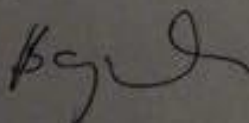


Vyjádření vedoucího práce

*Žádost o odklad termínu odevzdání bakalářské práce souhlasím. Pilátová*

Vyjádření vedoucího katedry

*Souhlasím*



## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

## **PODĚKOVÁNÍ**

Především bych velmi ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Kateřině Strnadové, za příkladné vedení a výbornou spolupráci, odborné rady, doporučení literatury k danému tématu a především, za její trpělivost.

Další poděkování patří konzultantce mé bakalářské práce Ing. Věře Jenčové Ph.D. za její poskytnuté odborné rady, ochotné jednání a spolupráci. Dále také Ing. Jiřímu Chvojkovi Ph. D. za poskytnuté materiály, které byly využity při testování v experimentální části a poslední poděkování patří všem dalším pracovníkům Katedry tkáňového inženýrství na Technické univerzitě v Liberci.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce se zabývá testováním námi vybraných materiálů. Konkrétně se jedná o nanovláknennou strukturu z polykaprolaktonu (PCL) vyrobenou na Technické univerzitě v Liberci a dermálního kožního krytu XeDerma®, který byl použit jako materiál referenční. Testování proběhlo na základě toho, zda jsou výše zmíněné materiály vhodné k využití v regenerativní medicíně jako kandidáti tkáňových nosičů pro léčbu kožních poranění. V teoretické části budou popsány vybrané technologie tvorby tkáňových nosičů. Dále budou popsány kryty ran, proces hojení a princip tkáňového inženýrství. Experimentální část se bude zabývat především *in vitro* testováním. Jednat se bude především o zjištění, do jaké míry jsou buňky na těchto materiálech schopny adherovat, proliferovat a především migrovat.

## **Klíčová slova**

Tkáňový nosič, kůže, kryt na rány, proces hojení, meltblown, elektrostatické zvlákňování

## **Annotation**

This bachelor thesis focuses on testing of materials of our choice. These are in particular a nanofibrous structure of polycaprolactone (PCL) made at the Technical University in Liberec and a dermal wound dressing XeDerma®, which was used as a referential material. Tests were done to find out if these materials are suitable to be used in regenerative medicine as candidates of scaffolds for treating skin injuries. In the theoretical part technologies, which can be used for scaffolds fabrication, will be described. The following chapter describes different types of wound dressings, process of wound healing and the principle of tissue engineering. The experimental part describes the *in vitro* testing. The thesis was mainly about finding out how the cells are able to adhere to these materials, how the cells proliferate and most importantly how the cells migrate on the chosen materials.

## **Key words**

Scaffold, skin, wound dressing, wound healing, meltblown, electrospinning



## Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	11
<b>I. Úvod</b> .....	12
<b>II. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	13
<b>1 Tkáňové nosiče</b> .....	14
1.1 Tkáňové inženýrství .....	14
1.2 Požadavky kladené na scaffold .....	15
1.3 Materiály pro přípravu nanovlákných scaffoldů .....	16
1.3.1 Polykaprolakton (PCL) .....	16
<b>2 Výroba scaffoldů</b> .....	17
2.1 Textilní výroba scaffoldů .....	17
2.1.1 Netkané textilie .....	18
2.1.2 Nanovlákné scaffoldy .....	18
2.2 Metody výroby netkaných textilií .....	19
2.2.1 Technologie Meltblown .....	19
2.2.2 Proces výroby technologie Meltblown .....	20
2.2.3 Technologie Elektrostatické zvlákňování .....	21
2.2.4 Proces výroby technologie Elektrostatické zvlákňování .....	22
2.2.5 NanoSpider .....	23
2.2.6 Možné kombinace zvlákňovacích metod .....	24
<b>3 Obvazový materiál na kožní rány</b> .....	26
3.1 Suché obvazy .....	26
3.2 Obvazy pro vlhké hojení kožních ran .....	26
3.3 Moderní krycí prostředky .....	27
3.3.1 Hydrokoloidní krytí .....	27
3.3.2 Alginátová krytí .....	27
3.3.3 Hydrogelová krytí .....	27
3.3.4 Hydroaktivní pěnová krytí .....	28
3.3.5 Absorpční krytí s aktivním uhlím .....	28
3.3.6 Filmová krytí .....	28
3.4 Požadavky kladené na kryty ran .....	28
3.5 Biologická krytí .....	29
3.5.1 Kožní kryt XeDerma® .....	29
<b>4 Kůže</b> .....	30

4.1	Zevní vrstva kůže - pokožka.....	30
4.2	Střední vrstva kůže - škára.....	31
4.3	Podkožní vrstva.....	31
<b>5</b>	<b>Definice kožní rány .....</b>	<b>32</b>
5.1	Rozdělení kožních ran .....	32
5.1.1	Podle mechanismu vzniku .....	32
5.1.2	Podle délky léčby .....	32
5.1.3	Podle hloubky .....	32
5.2	Proces hojení kožních ran .....	33
5.3	Fáze hojení.....	33
5.3.1	Fáze zánětlivá (čistící, exsudativní) .....	33
5.3.2	Fáze proliferace (granulační) .....	34
5.3.3	Fáze remodelační.....	35
5.4	Faktory ovlivňující hojení ran.....	36
5.4.1	Lokální.....	36
5.4.2	Celkové.....	36
5.5	Buněčná migrace.....	36
5.5.1	"Scratch" test (poškrábání, zacelování rýhy).....	37
5.5.2	Testy pomocí zóny vyloučení buněk .....	37
5.5.3	Stlačovací test pomocí razítka .....	38
5.5.4	Působení chemikálií.....	39
5.5.5	Snímání elektrické impedance buněk .....	39
<b>III.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Použitý materiál .....</b>	<b>41</b>
6.1	Biologické testování <i>in vitro</i> .....	41
6.1.1	Použité chemikálie.....	41
6.1.2	Použité roztoky .....	42
6.2	Použité přístroje a programy .....	42
<b>7</b>	<b>Principy použitých <i>in vitro</i> testovacích metod.....</b>	<b>44</b>
7.1	MTT test.....	44
7.2	Elektronová mikroskopie .....	44
7.3	Fluorescenční mikroskopie .....	44
<b>8</b>	<b>Postupy .....</b>	<b>46</b>
8.1	Materiál.....	46

8.1.1	Sterilizace materiálu .....	46
8.2	Kultivace buněk .....	46
8.2.1	Pasážování .....	47
8.2.2	Nasazení buněk.....	47
8.2.3	Výměna média .....	48
8.3	Měření průměru vláken.....	48
8.4	MTT test.....	48
8.5	Příprava vzorků na SEM.....	49
8.6	Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii .....	49
<b>IV.</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Testování uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů .....</b>	<b>51</b>
9.1	<i>In vitro</i> testování .....	51
9.1.1	Fluorescenční mikroskopie.....	51
<b>10</b>	<b>Testování nanovláknenné struktury PCL a referenčního materiálu XeDerma®.....</b>	<b>56</b>
10.1	Morfologická analýza vláken.....	56
10.2	<i>In vitro</i> testování .....	58
10.2.1	MTT TEST .....	58
10.2.2	Fluorescenční mikroskopie.....	61
10.2.3	SEM.....	66
<b>V.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>68</b>
	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>70</b>
	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>75</b>
	<b>Seznam grafů.....</b>	<b>77</b>

## Seznam použitých zkratk

°C	stupeň Celsia
%	procento
μl	objemová jednotka; mikrolitr; dle SI $1 \times 10^{-6}$ l
BSA	hovězí sérový albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, kultivační médium
FBS	fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FM	fluorescenční mikroskopie
IPA	isopropylalkohol
kV	kilovolt
ml	objemová jednotka; mililitr; dle SI $1 \times 10^{-3}$ l
mm	délková jednotka; milimetr; dle SI $1 \times 10^{-3}$ m
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NC	negativní kontrola
nm	délková jednotka; nanometr; dle SI $1 \times 10^{-9}$ m
PBS	fosfátový pufr
PC	pozitivní kontrola
PCL	poly(ε-kaprolakton)
PGA	kyselina polyglykolová
PI	propidium jodid
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny polyglykolové a polymléčné
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
T <sub>g</sub>	teplota skelného přechodu
T <sub>m</sub>	teplota tání

## I. Úvod

V současné době jsou nanovlákná v tkáňovém inženýrství v centru zájmu mnoha institucí, vzhledem k jejich vlastnostem a struktuře, která do značné míry připomíná extracelulární matrix. Nanovláknenné tkáňové nosiče jsou využívány v tzv. regenerativní medicíně jako náhrady tvrdých či měkkých tkání. Jedná se např. o chrupavku, šlachy, cévy, kosti, kůži, atd.

Moderní tkáňové inženýrství se snaží o výrobu stále lepších nanovláknenných tkáňových nosičů, na kterých by buňky optimálně rostly, a tím došlo k rychlejšímu zhojení defektu, kdy je chybějící tkáň nahrazena novou. Jako velkou výhodu nanovláknenných scaffoldů, lze uvést jejich otevřenou porézní strukturu a obrovský měrný povrch, který umožňuje buňkám na tkáňovém nosiči dobře adherovat a zároveň podporuje jejich migraci. Na výrobu nanovláknenných materiálů lze využít celou řadu polymerů. Tyto materiály mohou být připraveny z přírodních biopolymerů, z polymerů syntetických, nebo ze smíšené nanovláknenné struktury, což je v podstatě kombinace obou předchozích.

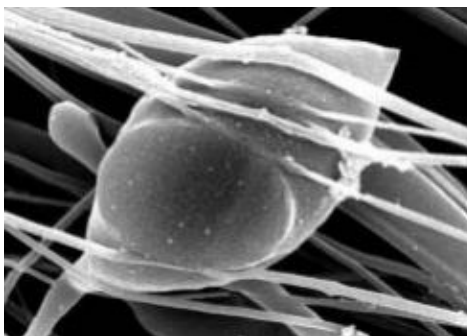
Tato bakalářská práce se skládá ze dvou částí, a to z teoretické části, která zahrnuje informace týkající se dané problematiky a z části experimentální. Hlavním cílem této práce bylo biologické testování vláknenných materiálů, které probíhalo na základě toho, zda jsou tyto materiály vhodné k využití v regenerativní medicíně jako kandidáti tkáňových nosičů pro léčbu kožních poranění. K testování byly využity dohromady dva materiály. Jako první materiál, lze uvést nanovláknennou strukturu z polykaprolaktonu (PCL), která byla vyrobena na Technické univerzitě v Liberci technologií elektrostatického zvlákňování, konkrétně se jednalo o produkční linku Nanospider<sup>TM</sup> Production Lines 500. Druhý materiál, který byl použit pro náš experiment je dermální kožní kryt XeDerma®, který je vyráběn společností Bio Skin, a. s. XeDerma® je komerčně dostupný materiál z decelularizované prasečí kůže. Pro naše testování byl tento materiál zvolen jako referenční, vzhledem k jeho využívání v regenerativní medicíně. Všechny vzorky byly testovány v biologické laboratoři na Katedře Tkáňového inženýrství a následně byly vyhodnocovány prostřednictvím rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), fluorescenční mikroskopie a MTT testu.

## **II. TEORETICKÁ ČÁST**

V teoretické části budou popsány scaffoldy a základní principy tkáňového inženýrství. Tato část se bude zabírat také charakteristikou polykaprolaktonu a komerčně dostupného materiálu XeDerma®, vzhledem k jejich využití při testování v experimentální části. Tato část bakalářské práce se bude věnovat popisu vybraných technologií tvorby tkáňových nosičů, jednat se bude především o technologii elektrostatického zvlákňování a technologii meltblown. Dále zde budou charakterizovány typy kožních ran, proces hojení a materiály používané na krytí ran.

## 1 Tkáňové nosiče

Tkáňový nosič neboli scaffold vyjadřuje v tkáňovém inženýrství tzv. podpůrnou konstrukci pro růst buněk (viz obr. 1) či celých tkání a lze ho považovat za základní předpoklad pro rozvoj moderního tkáňového inženýrství. Jeden z hlavních cílů moderního tkáňového inženýrství, je vývoj především biodegradabilních nosičů, které jsou využitelné v regenerativní medicíně. Základním požadavkem pro výrobu tkáňových nosičů je materiál, který je netoxický. Dále by měl být biokompatibilní a v ideálním případě, by se mělo jednat o materiál se strukturními a funkčními vlastnostmi, které jsou podobné nativnímu extracelulárnímu prostředí. Co se týká strukturního hlediska, scaffold může tvořit dvojrozměrnou nebo trojrozměrnou podporu pro růst tkáně, záleží na způsobu využití [1, 2].



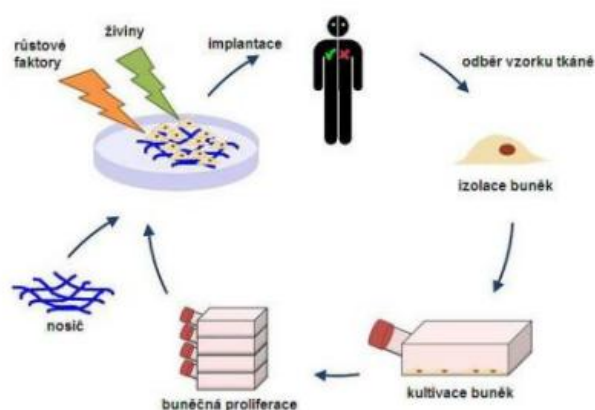
**Obr. 1: Kmenová buňka vlasového váčku sedící na scaffoldu z PCL nanovláken, tento snímek byl pořízen prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu [3]**

### 1.1 Tkáňové inženýrství

Přístup tkáňového inženýrství probíhá při standardním postupu v několika krocích a je zobrazen na obrázku 2. V tomto případě dochází k odběru buněk od dárce a jejich následné kultivaci. Kultivace buněk probíhá *in vitro* (mimo tělo dárce) za přítomnosti živin, růstových a diferenciačních faktorů. Poté, co je dosaženo potřebného množství buněk, se tyto buňky nanesou na předem připravený scaffold o požadovaných vlastnostech. Sledována je jejich adheze ke tkáňovému nosiči a proliferace. Po určité době, kdy jsou buňky na scaffoldu kultivovány je možná implantace tkáňového nosiče zpět na postižené místo do těla pacienta. Implantace scaffoldu a následná regenerace tkáně probíhá *in vivo*, tedy v těle pacienta. Čas potřebný k očekávané degradaci scaffoldu, musí být shodný s časem, který byl potřebný

k vytvoření nové tkáně. Postup tkáňového inženýrství lze různě modifikovat. Jako další přístup je možné zmínit implantaci samotného scaffoldu do těla příjemce a nechat tělo, aby si tkáň dotvořilo samo, v tomto případě se scaffold využívá pouze jako lešení [2].

Buňky využitelné v tkáňovém inženýrství mohou být autologní, jedná se o pacientovu vlastní tkáň, která je pouze přenesena na jiné místo téhož pacienta, a tím odpadá riziko odmítnutí tkáně imunitním systémem. Dále je možné využít buňky alogenní, což je v podstatě tkáň od jiného dárce, ale stejného živočišného druhu. Tento způsob dárcovství je v praxi nejběžnější, ale dochází ke zvyšování rizika, odmítnutí tkáně imunitním systémem příjemce vzhledem ke genetické odlišnosti. Poslední možností je odběr buněk od jiného živočišného druhu a tento typ implantátu se nazývá xenogenní. V tomto případě je riziko odmítnutí tělem příjemce nejvyšší, jelikož rozdíly mezi jednotlivými živočišnými druhy jsou mnohem větší, než rozdíly mezi jedinci stejného druhu [2, 4].



**Obr. 2: Princip procesu tkáňového inženýrství [5]**

## 1.2 Požadavky kladené na scaffold

Scaffold musí mít určité vlastnosti a splňovat požadavky, které jsou na něj kladené v závislosti na způsobu a místě jeho využití. Hlavní funkcí scaffoldu je poskytnout tkáni dočasnou podporu a tím usnadnit její regeneraci. Mezi základní požadavky, které jsou na scaffold kladeny, patří biokompatibilita, kterou musí tkáňový nosič splňovat vzhledem k invazivnímu využití v lidském organismu. Dále by měl tkáňový nosič splňovat také určitou mechanickou pevnost, srovnatelnou s živou tkání v místě implantace a měl by mít kontrolovatelné povrchové vlastnosti (chemické a fyzikální). Vysoká porozita, propojení pórů a povrchová struktura má velmi pozitivní



vliv na migraci, adhezi a proliferaci buněk. V určitých případech je biodegradace scaffoldu vhodná, záleží však na aplikaci. Důležité je, aby doba rozpadu materiálu byla pokud možno časově totožná s dobou růstu daných buněk a remodelace extracelulární matrix [6].

### **1.3 Materiály pro přípravu nanovláknenných scaffoldů**

Na výrobu nanovláknenných scaffoldů je možné využít celou řadu polymerů, které lze rozdělit do tří skupin. Do první skupiny spadají přírodní biopolymery, jedná se například o kolagen, chitosan, želatinu a celulózu. Do druhé skupiny patří polymery syntetické, v tomto případě se jedná o využití např. kyseliny polymléčné (PLA), kyseliny polyglykolové (PGA) a polykaprolaktonu (PCL). Třetí skupina je tvořena smíšenými nanovláknennými strukturami, které jsou v podstatě kombinací první a druhé skupiny. K našim testovacím účelům, které jsou popsány v experimentální části, jsme si zvolily syntetický polymer polykaprolakton [7].

#### **1.3.1 Polykaprolakton (PCL)**

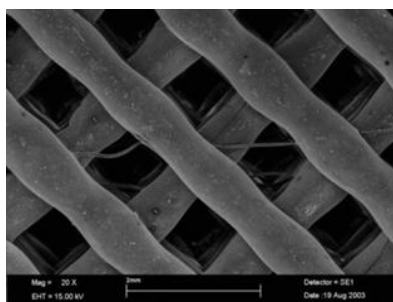
Polykaprolakton je biologicky degradovatelný semikrystalický polyester a jeden z nejvíce používaných polymerů v tkáňovém inženýrství. Tento biodegradabilní syntetický polymer je biologicky odbouratelný a vyznačuje se nízkou teplotou tkání ( $T_m$ : 58~60 °C) a nízkou teplotou skelného přechodu ( $T_g$ : -60 °C). PCL spadá do skupiny alifatických polyesterů a je rozpustný v nepolárních rozpouštědlech. Vyznačuje se dobrými mechanickými a zpracovatelskými vlastnostmi. Může být využíván v průmyslu v oblasti obalové techniky, dále v oblasti zemědělských aplikací a nelze opomenout oblast biomedicíny vzhledem k jeho významnosti z hlediska biokompatibility s živým organismem [7, 8].

Na Technické univerzitě v Liberci na katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů je polykaprolakton hojně využíván jako materiál pro výrobu scaffoldů pro tkáňové inženýrství, jelikož patří k nejpoužívanějším polymerům pro *in vitro* testy. Z tohoto důvodu byl zvolen i pro naše testování [7].

## 2 Výroba scaffoldů

Scaffoldy jsou, jak již bylo v této práci zmíněno, nosiče využívané v tkáňovém inženýrství. Jedním z hlavních důvodů jejich využití, je jejich porézní struktura tvořící oporu pro růst buněk a v případě 3 D struktury umožnění proliferace buněk do celého objemu scaffoldu. Scaffoldy je možné dle technologie výroby rozdělit na textilní výrobu scaffoldů, netextilní výrobu scaffoldů, nebo jejich kombinaci. Mezi klasické textilní technologie patří především technologie tkaní, pletení a výroba netkaných textilií. Výsledkem textilních technologií jsou vlákenné scaffoldy [2, 7].

Mezi netextilní výrobu scaffoldů patří metody „self-assembly“, „solvent casting“, „rapid prototyping“ (viz obr. 3), „laser-assisted bioprinting“ a jiné. Tyto netextilní metody, je možné při výrobě tkáňových nosičů kombinovat s ostatními textilními technologiemi. Podrobněji jsou popsány v knize Lékařské textilie 2. díl a v této bakalářské práci nebudou více rozebírány [2].



**Obr. 3: PLGA scaffold vyrobený technologií rapid prototyping [2]**

### 2.1 Textilní výroba scaffoldů

Textilní technologie jsou hojně využívány k výrobě tkáňových nosičů, jelikož umožňují vyrábět vysoce porézní vlákenné materiály. Takto vyrobené scaffoldy, lze dělit podle jejich vlastností, jako je tvar (lineární, dvojrozměrné či trojrozměrné struktury), porozita, průměr, délka a tvar vláken, mechanické vlastnosti, povrchové úpravy, použitý materiál atd. [2].

Tkáňové nosiče vyrobené textilní metodou splňují požadavky nejen otevřené porézní struktury, jak již bylo zmíněno výše, ale poskytují buňkám také velký specifický povrch, aby buňky mohly dobře adherovat. V této práci budou dále obecně charakterizovány netkané textilie a technologie jejich výroby. Jednat se bude o technologii meltblown, technologie elektrostatického zvlákňování a jejich možnou kombinaci [2, 7].

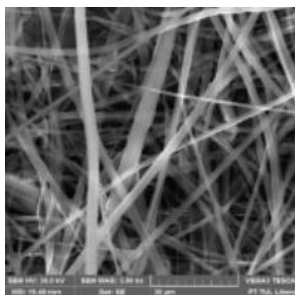
### 2.1.1 Netkané textilie

Nanovlákná lze charakterizovat jako vlákna, která mají průměr menší než 1000 nm. Nanovlákná se vzhledem k využití nevyskytují samostatně, ale jsou uspořádána do vyšších strukturálních celků. Jednat se může např. o nanovláknennou vrstvu, neboli netkanou textilií, s kterou je pak možná reálná manipulace [7]. Mezi výhody netkaných textilií patří např. vysoká porozita s vhodnou velikostí pórů pro dobré pronikání buněk do scaffoldu, velikost a povrch vláken pro dobrou adhezi buněk a možnost tvorby trojrozměrných struktur [2, 7].

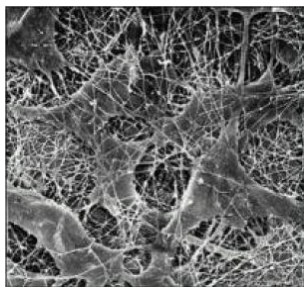
V současnosti nabízejí nanovláknenné netkané textilie možnost využití v mnoha medicínských oborech. Je tomu tak i v oblasti textilních tkáňových nosičů, kde převládají především již zmíněné netkané textilie. Jeden z důvodů využití netkaných textilií ve zdravotnictví, je snaha napodobit vnitřní strukturu mezibuněčné hmoty v lidském těle, která se skládá z kolagenových vláken, které mají rozměry také v nanometrech stejně jako nanovlákná. Úspěšné využití nanostruktur, jako léčebných prostředků, spočívá ve schopnosti napodobit přirozenou morfologii organismu a v mnoha případech mohou díky své morfologii podporovat buněčný růst v místech, kde je tkáň poškozená [2, 7].

### 2.1.2 Nanovláknenné scaffoldy

Mezi velké výhody nanovláknenných scaffoldů, patří kromě otevřené porézní struktury, také jejich obrovský měrný povrch, díky kterému je umožněna dobrá buněčná adheze, proliferace a také migrace buněk do hloubky scaffoldu v případě trojrozměrné struktury. Nanovláknenné vrstvy představují strukturu, která je do značné míry schopná připomínat nativní extracelulární matrix (viz obr. 4). Pro porovnání, obr. 5 dokumentuje fibroblasty v kolagenové pojivové tkáni [7].



**Obr. 4: Nanovláknenný scaffold z elektronové mikroskopie, zvětšení 3000x, materiál polykaprolakton [7]**



**Obr. 5: Elektronová mikroskopie fibroblastů v kolagenové pojivové tkáni z rohovky potkana [9]**

## **2.2 Metody výroby netkaných textilií**

Elektrostatické zvlákňování je vhodná metoda pro výrobu 2D scaffoldů, které mohou být využitelné např. jako materiály pro krytí ran. Touto metodou byl vyroben i polykaprolakton, který byl využit při testování v experimentální části. Jako zástupce pro výrobu 3D scaffoldů, lze uvést technologii meltblown, kterou lze kombinovat s technologií elektrostatického zvlákňování, dle článku Erben et al. (2015) [7, 11].

Tato kapitola se bude zabývat výrobou netkaných textilií. Bude zde detailně popsán princip technologie meltblown, elektrostatického zvlákňování a další možné kombinace zvlákňovacích metod. Proces výroby jednotlivých technologií bude doplněn o schémata, které poslouží k názorným ukázkám a vysvětlení jednotlivých procesů výroby.

### **2.2.1 Technologie Meltblown**

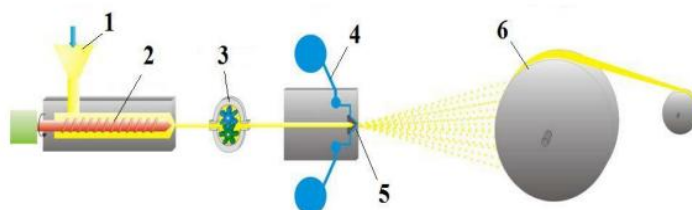
Technologie meltblown je komerčně využívána od počátku 80 let a v České republice, byla uvedena do provozu první linka v roce 1992 firmou Ecotherm Mělník. Tato metoda vyrábí výrobky, které se skládají z vláken volitelných průměrů, typická jsou například mikrovlákná o průměru 2–4  $\mu\text{m}$ , která se vyznačují velkým měrným povrchem. Touto technologií se samozřejmě dají vyrobit i textilie z mnohem jemnějších vláken (0,1  $\mu\text{m}$ ), nebo také textilie z vláken o běžných textilních jemnostech (10–15  $\mu\text{m}$ ). Mezi nejčastěji využívané polymery patří polyamid, polypropylen či polyetylen [10].

V současné době se jedná o velmi využívanou metodu a produkty vyrobené prostřednictvím této technologie, najdou své uplatnění v mnoha hygienických, technických a lékařských odvětvích. Takto získané produkty lze využít jako filtrační

média, zdravotnické textilie, sorpční vložky, dýchací masky, hygienické výrobky atd. Tato metoda je oproti technologii elektrospinning velmi energeticky náročná, vzhledem k ohřevu velkého množství vzduchu a jeho transportu prostřednictvím vysokého tlaku [11].

### 2.2.2 Proces výroby technologie Meltblown

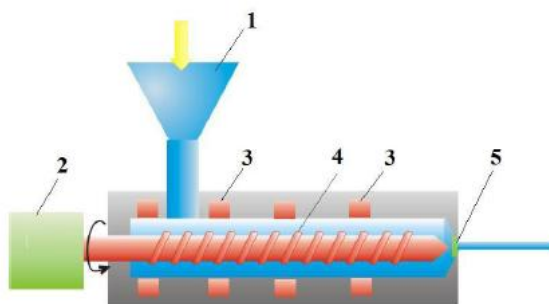
Celý proces výroby, který je popsán níže se skládá z několika základních operací a je znázorněn na obrázku 6.



**Obr. 6: Schéma Meltblown: 1 - extrudér, 2 - plnicí šnek, 3 - dávkovací čerpadlo, 4 - vzduchové rozvody, 5 - zvlákňovací hubice, 6 - kolektor [12]**

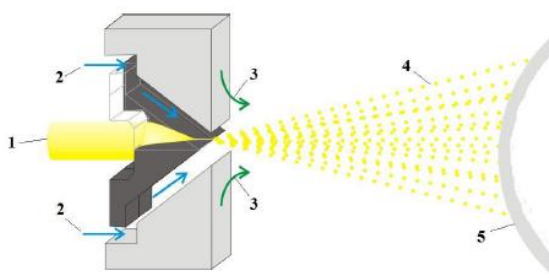
Technologie meltblown je jednostupňový proces, při kterém dochází k foukání roztaveného polymeru proudem vzduchu s poměrně vysokou rychlostí. Roztavený polymer, je vytlačovaný prostřednictvím trysky z extrudéru, na plochu perforovaného sběrného pásu či bubnu. Vytvořená vlákna se formují a částečně pojí do vláknenné vrstvy na sběrném segmentu a jsou dále odvíjena [10, 13].

Na počátku samotného procesu, prochází polymer extrudérem, který slouží k tavení polymeru a k transportu taveniny. Extrudér je jedním z velice důležitých prvků ve všech zpracováních polymerů a skládá se z vyhřívaného válce s rotujícím vytlačovaným šroubem uvnitř, jak je znázorněno na obrázku 7. Jeho hlavní funkcí je roztavení polymerního granulátu a jeho následného vytlačení přes trysku. Dopředný pohyb polymeru, probíhá podél horkých stěn válce mezi stěnou válce a šroubem. Tání granulátu v extrudéru je způsobeno díky vysoké teplotě, třením viskózního proudění a mechanickým působením mezi šroubem a stěnou válce [13].



**Obr. 7: Schéma tavného extrudéru: 1 - násypka polymerního granulátu, 2 - motor, 3 - externí ohříváče, 4 - vytlačovací šnek, 5 - filtr [12]**

Poté prochází tavenina přes dávkovací zubové čerpadlo, což je nezbytné pro přísun taveniny do zvlákňovací hubice. Vlákna jsou tvořena ve speciální výtlačné hubici, kterou znázorňuje obrázek 8. Výtlačná hubice je charakteristická mnoha zvlákňovacími otvory, které jsou vyvedeny na hraně hubice, a je k nim přiváděn stlačený horký vzduch. Pomocí proudu vzduchu, je vytékávající tavenina strhávána a následně formována, do tvaru vlákna na perforovaném sběrném kolektoru [10].



**Obr. 8: Proces Meltblown zvlákňování: 1 - polymerní tavenina, 2 - horký vzduch, 3 - studený vzduch, 4 - proud dloužených vláken, 5 - kolektor [12]**

### 2.2.3 Technologie Elektrostatické zvlákňování

Technologie elektrostatické zvlákňování (anglicky electrospinning) je známá již přes sto let a v posledních dvaceti letech získala na popularitě, vzhledem ke zvýšenému zájmu o nanovědu. Elektrostatické zvlákňování, je všeobecně velmi známá technologie pro polymerní nanovláknenné materiály s ohledem na jejich uplatnění pro biomedicínské a technické aplikace [14]. Tento postup umožňuje výrobu polymerních vláken s průměry, které se pohybují v rozmezí 50 nm až 1  $\mu\text{m}$  [7].

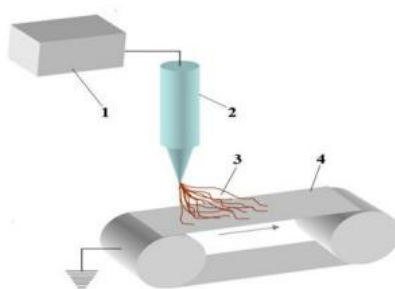
Elektrospinning patří v současné době mezi jednu z nejrozšířenějších nanotechnologií, jelikož se tímto principem výroby připravují materiály pro tkáňové

inženýrství. Jedná se např. o kryty na rány, nosiče pro řízené uvolňování léčiv a své uplatnění najdou také v technických aplikacích. V současnosti je možné elektrostaticky zvláknovat nejrozličnější polymery a kopolymery. Mezi nejpoužívanější syntetické materiály v tkáňovém inženýrství, které jsou zpracovávány technologií elektrostatického zvláknování, patří např. kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kopolymer kyseliny polyglykolové a polymléčné (PLGA) a polykaprolakton (PCL) [7].

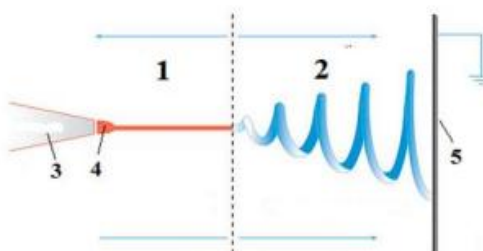
Tato technologie je založena na principu využití elektrostatického pole, které působí na elektricky nabitě viskoelastické kapaliny (polymerní roztok či taveninu). Vlivem elektrického pole, dochází k narušení povrchu polymerního roztoku a formování tzv. Taylorova kužele. Ve chvíli, kdy elektrostatické síly překonají povrchové napětí, je z Taylorova kužele vytažen velmi tenký proud roztoku, který se v bičovací zóně vydlouží na nanovlákná. Vzniklá vlákna jsou současně ukládána na kolektor. Mezi základní principy zvláknování, patří zvláknování z jehly, zvláknování z tyčky, z válečku a také ze struny [10, 15].

#### **2.2.4 Proces výroby technologie Elektrostatické zvláknování**

Celý proces elektrostatického zvláknování je znázorněn na obrázku 9. Tento proces využívá elektrostatické a kapilární síly k vytažení vláken z polymerního roztoku. Zvláknovací elektroda, tryska, nebo kapilára je udržována v kladném, nebo záporném náboji pomocí stejnosměrného napájecího zdroje (elektroda vysokého napětí), v řádech desítek kilovoltů (kV) a nabíjí viskoelastickou kapalinu. Protipól je uzemněn, popřípadě může být nabit záporně či kladně, ale vždy musí být docíleno rozdílu elektrického potenciálu pro daný druh specifického polymerního roztoku. Na polymerní roztok působí tři síly, jedná se o sílu povrchového napětí, sílu elektrostatickou a kapilární a dohromady formují Taylorův kužel, jak je možné vidět na obrázku 10 [16]. Ve chvíli, kdy elektrostatické síly překonají povrchové napětí, dojde k vytažení polymerní kapky a vzniku velmi tenké vlákenné trysky. Tato vlákenná tryska se následně v bičovací zóně vydlouží až na nanovlákná, která se shromažďují na kolektoru, opatřeném např. netkanou textilií [15]. Vzdálenost mezi zvláknovací tryskou a kolektorem se zpravidla pohybuje mezi 15 a 30 cm. V závislosti na použitém polymeru je možné upravit teplotu a relativní vlhkost pro zvláknování [12].



**Obr. 9: Schéma obecného procesu elektrostatického zvlákňování z trysky:**  
**1 - zdroj vysokého napětí, 2 - tryska s polymerním roztokem, 3 - proud nanovláken, 4 - uzemněný kolektor s nanovláknennou vrstvou [12]**



**Obr. 10: Znázornění proudění polymerního roztoku: 1 - oblast stabilního proudu, 2 - oblast nestabilního proudu, 3 - tryska, 4 - Taylorův kužel, 5 - uzemněný kolektor [17]**

### 2.2.5 NanoSpider

Tato technologie je založena na elektrostatickém zvlákňování z válce nebo ze struny. Nanospider<sup>TM</sup> Production Linec 500, který je zobrazen na obrázku 11, je unikátní zařízení společnosti Elmarco, který slouží pro výrobu nanovláknenných materiálů a byl použit i pro výrobu nanovláknenné struktury z polykaprolaktonu (PCL), která posloužila pro naše testování. V našem případě se jednalo o zvlákňování ze struny[18].

Princip této metody, je založen na zvlákňování z tenké vrstvy roztoku polymeru. Na povrchu rotujícího válce (či struny) se vytváří tenká vrstva polymerního roztoku a vlivem vysokého napětí je nabíjena. Ve chvíli, kdy dojde k přesáhnutí kritické hodnoty, vznikne na povrchu kapaliny velké množství trysek (Taylorův kužel), ze kterých je vytažen velmi tenký proud roztoku, který se v bičovací zóně vydlouží na nanovlákná [18].

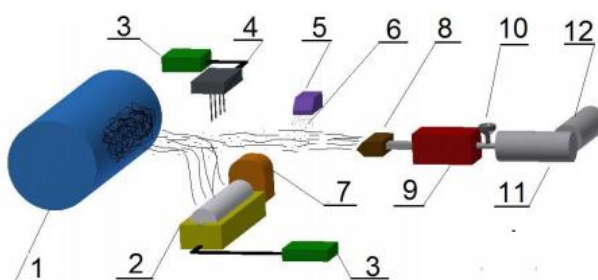




**Obr. 11: Zařízení Nanospider™ Production Lines 500 [18]**

### 2.2.6 Možné kombinace zvlákňovacích metod

V současnosti je možné metody elektrostatického zvlákňování kombinovat s jinými technologiemi. Jednat se může například o kombinace technologií meltblown, kterou lze dále kombinovat např. s vibračním naprašováním částic. Výroba probíhá kontinuálně a všechny technologie jsou zakomponovány do jednoho kroku, jak znázorňuje obrázek 12. Není tedy nutné jakékoliv další lepení či tvarování [11].



**Obr. 12: Schéma kombinace uspořádání technologie meltblown v kombinaci s elektrostatickým zvlákňováním a vibračním naprašováním částic : 1 - sběrný kolektor, 2 - polyamidový zásobník polymerního roztoku, 3 – zdroje vysokého napětí, 4 – jehlový kolektor, 5 – vibrační naprašovací zařízení, 6 – proud vzduchu s vlákny a částicemi, 7 – elektromotor, 8 – tryska, 9 – extrudér, 10 – zásobník, 11 – převodovka, 12 – motor [11]**

Tato studie je popsána v práci Erben et. al (2015). Cílem této studie, byla výroba nového kompozitního materiálu, využitelného pro kostní tkáň, který se skládá z nanovláken, které byly vyrobeny technologií meltblown v kombinaci s elektrostatickým zvlákňováním a s vibračním naprašováním částic. Zajištěna byla tedy nejen optimální trojrozměrná porézní struktura takto vyrobeného materiálu, ale také dobré mechanické vlastnosti. Úspěšné *in vitro* testování scaffoldu dokázalo, že kompozitní materiály které jsou vyrobeny kombinací meltblown

a elektrospinningu, mají oproti materiálům vyrobených z jednoduchých meltblown materiálů, dostatek povrchových vlastností a porézní strukturu. Tyto vlastnosti jsou výhodné nejen pro růst buněk, ale také pro dobrou adhezi a proto mohou sloužit takto vyrobené scaffoldy, jako kostní náhrady aplikované v kostním tkáňovém inženýrství [11].

Další možností je výroba 3D materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování a metody rapid prototyping. Tato metoda je kombinací nanovláken a trojrozměrného tisku. Princip spočívá ve vytvoření nanovlákněné struktury pomocí elektrostatického zvlákňování. Na vytvořenou nanovlákněnou vrstvu jsou natisknuty navržené matice z medicínského materiálu, který je navržen pro 3D tiskárny a tím je možné vyrobit 3D nanovlákněné materiály [19].

Nanovlákněná vrstva, vyrobená technologií elektrostatického zvlákňování a zvolený vzor, může umožňovat dokonalou adhezi pro buňky. Stejně tak materiály vyrobené kombinací zvlákňovacích metod, se vyznačují vlastnostmi, které jsou výhodné nejen pro růst buněk, ale také pro dobrou adhezi. Další výzvou pro budoucí postupy v tkáňovém inženýrství, může tedy být testování těchto materiálů a jejich možné využití při léčbě kožních poranění [11, 19].

### **3 Obvazový materiál na kožní rány**

Obvaz je materiál, který slouží k překrytí rány. Obvazové materiály, lze rozčlenit do dvou skupin. První skupina zahrnuje suché obvazy, jedná se například o gázu, vatu, buničinu či tkané obvazivo. Do skupiny druhé spadají obvazové materiály pro tzv. vlhké hojení rány, které jsou v současnosti považovány moderním trendem v hojení kožních ran. Je zjištěno, že tzv. vlhké hojení je oproti hojení klasickou suchou cestou mnohem účinnější. Rána se hojí rychleji a kvalitněji, ve vlhkém prostředí s permeabilním obvazem, oproti ráně, která je udržována v prostředí suchém [2].

#### **3.1 Suché obvazy**

Klasické suché obvazové materiály mají tendenci k traumatizování kožního defektu, protože se musí často vyměňovat, jinak mohou přisychat ke spodině rány a při výměně pak může dojít ke stržení kožního strupu. Právě častá frekvence výměny obvazů způsobuje ochlazování rány, což může způsobit změny pH v ráně a vést k množení přítomných mikroorganismů. Další nevýhodou suchých obvazových materiálů oproti vlhkému krytí, je daleko menší schopnost odvodu vodních par a plynů z kožního defektu, a také jejich nízká bariéra proti infekcím [20].

#### **3.2 Obvazy pro vlhké hojení kožních ran**

Jak již bylo zmíněno, moderním trendem v současnosti je vlhký způsob ošetřování ran. Tato technologie zaznamenala prudký rozvoj v 90 letech minulého století a v současnosti nabízí trh poměrně velké množství takto upravených materiálů k léčbě kožních ran. Technologie byla v minulosti vyvinuta především k léčení chronických ran, ale dnes své uplatnění nachází v mnoha oblastech medicíny a stává se tak nedílnou součástí ošetrovatelské péče. Vlhké prostředí v ráně urychluje hojení, protože tekutina, která je ránou vylučovaná, obsahuje velké množství výživných a růstových látek, které vzhledem ke svým vlastnostem přispívají k úspěšnému hojení. Mezi další výhody moderních materiálů užívaných k ošetřování ran patří např. ochrana před bakteriemi, omezení bolestivosti, snížení frekvence převazů, schopnost materiálu kopírovat spodinu rány a eliminace zápachu [21, 22].

### **3.3 Moderní krycí prostředky**

Moderní prostředky využívané k lokální léčbě ran, mohou mít různou konzistenci a materiálové složení. Při volbě krytu je nutné respektovat nejen charakter kožní rány, ale také intenzitu sekrece. Vždy je nutné dbát na to, aby kryt na ráně vytvořil fyziologické prostředí, ve kterém dojde k rozvíjení reparačního procesu, který bude vést k co nejrychlejšímu zhojení kožní rány. Dnešní farmaceutický průmysl nabízí velké množství moderních krycích prostředků, které jsou vyvinuty na základě nejnovějších poznatků o hojení rány. Tyto kryty je možné rozdělit do základních skupin, které budou vyjmenovány a popsány v této kapitole [21, 23, 25].

#### **3.3.1 Hydrokoloidní krytí**

Z historického hlediska se jedná o nejstarší obvazy nové generace, vytvářející vlhké prostředí. Obvazy se skládají z polyuretanové fólie a savé vrstvy hydrokoloidu. Vrstva hydrokoloidu zajišťuje příznivé klima pro hojení rány s vlhkostí kolem 90 % a také reaguje se sekretem rány a vytváří tak gelovou hmotu, která se ideálně přizpůsobí povrchu rány [2, 23].

#### **3.3.2 Alginátová krytí**

Tato krytí jsou vyráběna z výtažků z hnědých mořských řas a lze je charakterizovat jako krytí se značnou absorpční schopností. Alginát je polysacharid, který se skládá z kyseliny manuronové a glukuronové. Alginátová vlákna se při kontaktu se sekretem rány změní v nepřílnavý gel, který začne účinkovat jako vlhký obvaz a současně se sekretem rány dochází k pojmání zbytků bakterií, hnisu a odumřelých buněk. Je tedy zřejmé, že rána je prostřednictvím alginátového krytu samovolně čištěna [2, 23].

#### **3.3.3 Hydrogelová krytí**

Tyto kryty na rány, jsou prezentovány jako hydrogely trojdimenzionální struktury, které se skládají převážně z polymerů nebo kopolymerů s vysokým obsahem vody. Řadíme je mezi obvazy z hydrofilních polymerů, které jsou schopny reagovat s vodními roztoky. Mezi jejich schopnosti patří rehydratace suché tkáně, ale stejně tak, jsou tyto kryty schopny absorbovat sekret exsudujících ran. Pro pacienta jsou velice komfortní, jelikož po aplikaci ránu chladí, a tím snižují bolestivost rány [2, 23].

### **3.3.4 Hydroaktivní pěnová krytí**

Hydroaktivní krytí jsou polopropustné obvazy, skládající se z pěnové polyuretanové hmoty, která v sobě má zakomponované gelové superabsorbéry. Tyto kryty jsou schopny absorbovat ze sekretu rány vodu, bakterie a odumřelé buňky, ale bílkoviny a vitaminy v ráně ponechávají. Hydroaktivní krytí stimuluje granulaci a epitelizaci a chrání ránu před vysušením a jinými zevními vlivy [23].

### **3.3.5 Absorpční krytí s aktivním uhlím**

Tento kryt se skládá z jemné nedráždivé pleteniny, která obsahuje aktivní uhlí, které je schopné pohlcovat bakterie, čistit ránu a je redukovat zápach. Tyto kryty jsou charakteristické značnou absorpční schopností, a jsou tedy vhodné na silně sekretující rány [2, 23].

### **3.3.6 Filmová krytí**

Tyto kryty se skládají z polyuretanu a jsou dostupné ve formě průhledné fólie, která je opatřena adhezivní úpravou. Filmové krytí chrání nejen povrch rány, ale je schopné vytvořit také účinnou bariéru proti vstupu bakterií. Využívají se při léčení povrchových defektů, nebo je lze využít jako kryt sekundární [2].

## **3.4 Požadavky kladené na kryty ran**

Ideální kryt na rány, by měl být schopen splňovat určitou interakci mezi pokožkou a materiálem. Správně zvolený druh krytu na rány, je základním předpokladem pro správné a rychlé zhojení kožní rány [24].

Mezi základní požadavky, které jsou na obvazový materiál kladeny, patří dostatečná pevnost materiálu, tak aby kožní rána byla v průběhu hojení chráněna. Pro zajištění co nejmenšího omezení v hybnosti pacienta, je důležitá dostatečná pružnost materiálu. Dále by měl zajišťovat určitou vlhkost rány (nikoli ránu mokrou) a schopnost vytvářet ideální prostředí, pro epitelizaci rány. Mezi další požadavky, patří schopnost krytu vytvářet účinnou bariéru proti infekcím a být nepropustný pro mikroorganismy. Dále nesmí působit toxicky na lidský organismus a nesmí vyvolávat alergické reakce [20, 24].

### 3.5 Biologická krytí

V poslední době se začínají využívat biologické kožní kryty. Jedná se v podstatě o biologické dermální a dermoepidermální kožní náhrady, které jsou průmyslově vyráběné. Aby mohl proběhnout úspěšný způsob léčby prostřednictvím biologického krytu, granulující spodina musí být čistá a zbavená nežádoucích patogenů a povlaků. Toto je v podstatě základní předpoklad úspěšné léčby. Tato práce se bude zabývat dermálním kožním krytem XeDerma®, vzhledem k jeho využití při testování, které je dále popsáno v experimentální části [25].

#### 3.5.1 Kožní kryt XeDerma®

Jedná se o sterilní biologický kryt (viz obr. 13) z bezbuněčné prasečí kůže, který je určen pro léčbu akutních a chronických ran, vzhledem k jeho schopnosti zajistit pro ránu vhodné prostředí. Tento komerčně dostupný materiál je na trhu k dostání od roku 2007 a je dodáván společností Bio-Skin, a. s. Tento materiál je k dostání ve své sterilní suché formě (možnost dlouhodobého skladování), pokud je ale hydratován, jeho biologické vlastnosti jsou podobné vlastnostem normální lidské kůže [26]. XeDerma® je vyrobena z prasečích kožních štěpů, ze kterých je prostřednictvím enzymatické preparace odstraněna epidermis (pokožka) a všechny ostatní aktivní buňky dermis (škára). Zbylá matrix, což je v podstatě sterilní mezibuněčná hmota, je vhodná k léčbě kožních ran [23].



**Obr. 13: Kožní kryt XeDerma® [27]**

## 4 Kůže

Kůže je největší smyslový orgán našeho těla, který vytváří hraniční vrstvu mezi organismem a jeho okolím. Přibližně tvoří 12–16 % celkové tělesné hmotnosti a její plocha je u dospělého jedince 1,5–2,0 m<sup>2</sup>. Jeden centimetr čtvereční má 15 mazových žláz, 3000 nervových tělísek, 100 potních žláz, 1 metr cév a 3 miliony buněk. Kůže funguje jako bariéra a za normálních podmínek chrání člověka proti negativnímu vlivu zevního prostředí a mikroorganismů. Mezi pozitivní vlastnosti kůže patří regulace tělesné teploty, umožnění zbavování se odpadních látek, zadržování vody v organismu a vnímání chladu a tepla [28].

Kůži tvoří tři vrstvy tkáně (viz obr. 14): pokožka (epidermis), škára (dermis nebo korium), a podkoží (subcutis nebo tela subcutanea). Mezi další nedílnou součást kůže patří i přídatné orgány, které se nazývají kožní adnexa jedná se o vlasy, nehty, chlupy, potní žlázy a žlázy mazové [28].

### 4.1 Zevní vrstva kůže - pokožka

Jedná se o svrchní část tkáně, která je tvořena několika vrstvami kožních buněk. Pokožka tvoří ochrannou bariéru proti vnějším vlivům.

#### **Pokožka má 4 typy buněk:**

**Keratinocyty:** nacházejí se v nejspodnější vrstvě epidermis a migrují směrem k povrchu kůže, nové keratinocyty vznikají průběžným dělením a vyzríváním starších keratinocytů, během jejich migrace k povrchu pokožky dochází k jejich degeneraci a zvýšení obsahu bílkoviny keratinu, odumírají ve zcela povrchové vrstvě, kde se průběžně odlupují v podobě šupin a tím dochází k plynulé obměně pokožky [29]

**Melanocyty:** tyto buňky tvoří kožní pigment melanin a předávají ho keratinocytům, melanin je schopný pohlcovat škodlivé UV záření, které může ničit buňky hlubších vrstev a přispívá k zabarvení pokožky do hnědého tónu [29]

**Imunitní buňky:** hlavním úkolem těchto buněk je ochrana pokožky proti pronikajícím mikroorganismům, které jsou schopny pohltit a zneškodnit [29]

**Merkelovy buňky:** tyto buňky je možné charakterizovat jako dotykové receptory a vyskytují se v hlubších částech pokožky, jsou v kontaktu se senzitivním neuronem ve škáře (tzv. Merkelův disk) a společně slouží k vnímání dotyků [29]

## 4.2 Střední vrstva kůže - škára

Jedná se o pevnou a pružnou vazivovou vrstvu tkáně, která je tvořena kolagenními a elastickými vlákny.

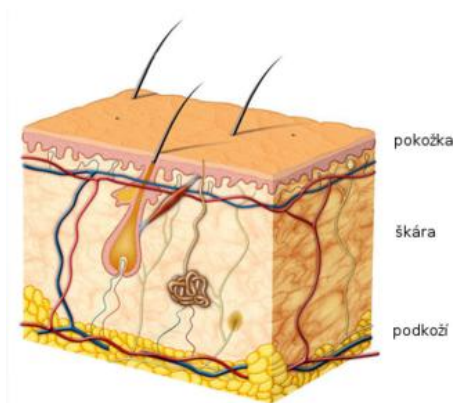
**Škáru tvoří 2 vrstvy:**

**Povrchová vrstva:** tuto vrstvu lze charakterizovat jako síť jemných elastických vláken s četnými vazivovými buňkami, do pokožky vybíhá prostřednictvím papil, které mají charakteristické uspořádání (tvoří vlny a rýhy) a promítá se do povrchové struktury pokožky, některé papily obsahují receptory kožního cití, jiné kličky krevních kapilár [29, 30]

**Hlubší vrstva:** vrstva je tvořena sítí pevných kolagenních vláken, ve kterých jsou uloženy vazivové a tukové buňky, v okách této sítě se nacházejí vlasové váčky, mazové a potní žlázy, cévy a nervy [29, 30]

## 4.3 Podkožní vrstva

Jedná se o nejhlubší vrstvu tkáně, která je uložena pod škárou a spojuje kůži se svaly. Podkožní vrstva je tvořena řídkým vazivem a tukovými buňkami, které jsou shluknuté do tukových polštářků a slouží jako zásobárna energie. Hlavní funkcí podkožní vrstvy je ochrana proti mechanickému poškození a teplotním vlivům [29, 30].



**Obr. 14:** Schéma stavby kůže [31]



## 5 Definice kožní rány

Ránu lat. Vulnus, lze definovat jako poranění normální anatomické struktury epiteliální vrstvy tkáně v důsledku zevních faktorů. Rána může být podle mechanismu vzniku způsobena fyzicky, chemicky, mechanicky, nebo se může jednat o tepelné poškození [32].

### 5.1 Rozdělení kožních ran

Rány mohou být klasifikovány v mnoha ohledech a toto rozdělení je uvedeno níže.

#### 5.1.1 Podle mechanismu vzniku

- Mechanické: jedná se o rány tržné, řezné, zhmožděné, tržně zhmožděné, tlakové, střelné, sečné, bodné, penetrující
- Chemické: rány vznikají po kontaktu pokožky s louhem, kyselinou či jinou chemickou látkou
- Aktinické: kontakt pokožky s radiačním zářením
- Termické: jedná se opařeniny, popáleniny či omrzliny [33, 34]

#### 5.1.2 Podle délky léčby

- Chronické: tyto rány se nehojí déle než 6-8 týdnů a často se pacientovi vracejí a i přes adekvátní léčbu nemají tendenci se hojit, typickým příkladem chronických ran jsou bérkové vředy, dekubity či komplikovaně se hojící pooperační rány [33, 34]
- Akutní: tyto rány vznikají ve zdravé kostní tkáni, která může být fyzikálně, mechanicky či termicky poškozena, hojí se obvykle v krátkém čase a bez komplikací, příčinou akutní rány, je ve většině případech úraz či chirurgický zákrok [33, 34]

#### 5.1.3 Podle hloubky

- Povrchové rány: jedná o poškození povrchové vrstvy pokožky (epidermis)
- Hluboké rány: poškozeny jsou všechny tři vrstvy tkáně [33, 34]

## **5.2 Proces hojení kožních ran**

Hojení kožní rány je kontinuální a fyziologický proces, který vede k obnově porušené struktury tkáně, k obnově funkce kůže a ke kompletnímu uzavření kožního povrchu. V průběhu procesu hojení probíhá složitý biologický proces, který zahrnuje interakci různých typů buněk stimulovaných růstovými faktory, zánětlivými mediátory, enzymy, cytokiny a dalšími látkami. Hojení je v podstatě přirozený obranný mechanismus lidského těla a probíhá v několika fázích. Jednotlivé fáze hojení se vzájemně prolínají, časově překrývají a navazují na sebe. Pro doporučení vhodné léčby je nutná výborná znalost fázového hojení kožních ran [28, 35].

## **5.3 Fáze hojení**

Každá rána musí projít procesem hojení, který probíhá ve třech fázích, které na sebe nejen plynule navazují, ale mohou se i vzájemně překrývat. Tyto fáze jsou popsány a vysvětleny níže.

### **5.3.1 Fáze zánětlivá (čistící, exsudativní)**

Jedná se o fázi zásadní (viz obr. 15), která nastává bezprostředně po poranění a trvá přibližně tři dny. V této prvotní fázi, je velmi důležité co nejrychleji zastavit krvácení a ránu co nejefektivněji vyčistit. Během několika sekund od poranění dochází v místě porušení kožní tkáně k vazokonstrikci. Ta je nezbytná k zástavě krvácení do chvíle, než dojde k seskupování trombocytů a tím vytvoření zátky neboli trombu, který ránu uzavře a zároveň jí chrání před bakteriální kontaminací a ztrátou tekutiny. Hlavním mechanismem této fáze je hemostáza. Dochází při ní ke kontrakci hlavního svalstva a ke stažení porušených cév. V průběhu minut se zastavuje krvácení prostřednictvím aktivace a agregace destiček a vypouštění koagulačních faktorů. V místě poranění dochází k migraci leukocytů, jedná se především o neutrofily a makrofágy, které se podílejí prostřednictvím fagocytózy, což je v podstatě proces pohlcování bakterií a ostatních cizorodých látek, na čištění rány. Makrofágy uvolňují celou řadu cytokinů, chemotaktických látek a růstových faktorů. Přibližně po 3 až 4 dnech, dochází k zastavení migrace leukocytů, protože rána by měla být již čistá a zánětlivá fáze by se měla blížit ke konci a přecházet do fáze proliferační [33, 34, 36].



**Obr. 15: Fáze zánětlivá [36]**

### **5.3.2 Fáze proliferační (granulační)**

Jedná se o druhou fázi hojení ran (viz obr. 16), která nastává obvykle 3 až 5 den po poranění a překrývá se s fází zánětlivou. Přibližně za 4 až 5 dní od zranění dochází k aktivaci fibroblastů, které ve velkém množství produkují kolagen, ze kterého je vytvořena síť pevných kolagenních vláken a také proteoglykany, které podporují tvorbu kolagenních vláken a vytvářejí gelovou substanci extracelulární matrix. Ústředním procesem této fáze je migrace, proliferace a diferenciací buněk, které mají za cíl vytvořit nové cévy a vyplnit tak vzniklý defekt granulační tkáně, jejíž výstavba je závislá na fibroblastech. Fibroblasty jsou schopny migrovat do vytvořeného trombu a fibrinové sítě a využít ji jako provizorní matrix. Růstové faktory, mezi které patří cytokiny, které jsou produkovány buňkami imunitního systému např. makrofágy, jsou schopné stimulovat migraci a proliferaci buněk [33, 37].

Během této fáze dochází k epitelizaci kožní tkáně. Epitelizace je v podstatě vytvoření nové tělní tkáně a je úzce spjatá s granulační fází, která vytváří v podstatě nosnou plochu pro tvorbu nové tkáně. Dochází tedy k epitelizaci tkáně, která je rekonstruována z okrajů rány po provizorní matrix. Během této fáze je velice důležité udržování vlhkého prostředí vzhledem k migraci buněk, kterým vlhké prostředí více vyhovuje. Proliferační fáze trvá přibližně tři týdny a postupně přechází do remodelační fáze procesu hojení [33, 34, 37].



**Obr. 16: Fáze proliferační [36]**

### **5.3.3 Fáze remodelační**

Jedná se o konečnou fázi hojení (viz obr. 17), která nastává přibližně 21 dní po zranění a délka trvání této fáze může být 1 až 2 roky. V této fázi fibroblasty pokračují v produkci kolagenu, ze kterého je tvořena síť pevných kolagenních vláken. Kolagenní vlákna vytvářejí pevné vazby s jinými kolagenními vlákny, a také s molekulami bílkovin, a tím dochází ke zvyšování napětí v jizvě. Výsledkem remodelační fáze je pevná a epitelizovaná tkáň, jedná se v podstatě o primární jizvu (viz obr. 18), která však oproti původní tkáni před jejím poraněním ztrácí na elasticitě [36].



**Obr. 17: Granulační fáze [36]**



**Obr. 18: Jizva - výsledný stav po zhojení kožní rány [36]**

## **5.4 Faktory ovlivňující hojení ran**

Pro pochopení procesu hojení ran je nesmírně důležitá znalost faktorů, které hojení ran do značné míry ovlivňují. Proces hojení může být v kterékoliv fázi ovlivněn jak lokálními faktory, tak zejména faktory celkovými. Tyto faktory jsou rozděleny a vyjmenovány níže.

### **5.4.1 Lokální**

- Rozsah rány vzhledem k velikosti a hloubce
- Lokalizace
- Stáří rány
- Teplota rány
- Přítomnost infekce v ráně

### **5.4.2 Celkové**

- Stav imunity
- Věk
- Stav výživy
- Pooperační komplikace [38]

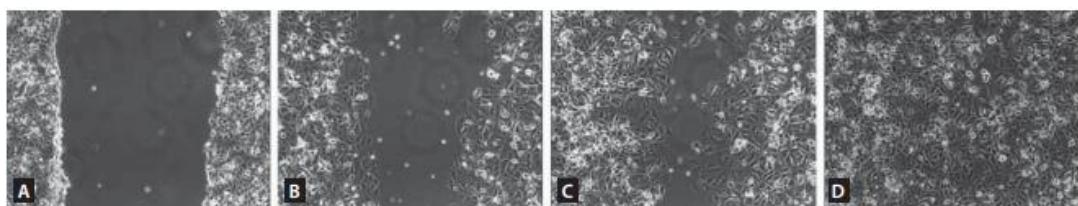
## **5.5 Buněčná migrace**

V procesu hojení kožních ran je buněčná migrace velice důležitá v okamžiku, kdy dojde k poškození kožní tkáně, vzhledem k migraci buněk do místa poškození, kde jsou buňky schopny poškozenou tkáň nahradit. Buněčná migrace hraje samozřejmě podstatnou roli v širokém spektru dalších biologických procesů. Jednat se může například o embryogenezi, což je embryonální vývoj člověka (trvá cca 8 týdnů od oplodnění vajíčka), kdy dochází k formování struktur zárodku. Důležité je zmínit, že buněčná migrace může být také podstatou procesů, které lidský organismus poškozují, jednat se může např. o metastázování nádorových buněk. Další příklady, při kterých migrace hraje důležitou roli, jsou např. imunitní odpověď či zánět [39, 40].

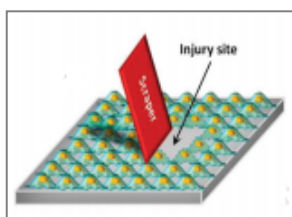
Pro studium migrace jsou nejčastěji využívány základní *in vitro* metody a některé z nich budou uvedeny a charakterizovány níže [39, 40].

### 5.5.1 "Scratch" test (poškrábání, zacelování rýhy)

Jedná se o běžně užívanou ekonomicky nenáročnou jednoduchou metodu (viz obr. 19), pomocí které je možné měřit základní parametry týkající se buněčné migrace. Tato metoda se využívá např. při studiu procesu hojení kožních poranění. Celý proces testování počíná kultivací buněk v kultivačním médiu. Po té, co buňky vytvoří z 80 % souvislou vrstvu na dně kultivační lahvičky, je do této souvislé vrstvy buněk např. sterilní špičkou vytvořena rýha o definované velikosti. Vytvoří se tedy prázdné místo v podobě rýhy a buňky vyskytující se na okraji této rýhy začnou samovolně migrovat směrem ke středu a v průběhu času toto políčko znovu zaplní. Celý proces této metody je znázorněn na obrázku 20 [40, 41, 42].



**Obr. 19: Čtyři stádia průběhu "Scratch" testu prováděného na buňkách linie MCF-7: A- vytvořená rýha o předem definované velikosti, B- stejné místo focené po 24 hod., C- stav po 72 hod., D- stav po 120 hod. [41]**



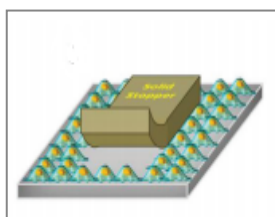
**Obr. 20: "Scratch" test [39]**

### 5.5.2 Testy pomocí zóny vyloučení buněk

Tato metoda je založena na principu prázdného pole, na které nemohou buňky adherovat. Existuje několik postupů jak prázdné pole vytvořit, lze využít např. zátky (viz obr. 21), biokompatibilní gel, ohrádky (inserty) či šablony. Princip této metody bude vysvětlen na příkladu se zátkou, v ostatních případech je princip stejný, ale pole je vytvořeno jinak. Celý postup začíná nasazením buněk kolem zátky, které jsou pěstovány

až do chvíle, kdy souvislá vrstva buněk pokryje dno kultivační nádoby z 80 %. Následně dojde k odejmutí zátky a buňky migrují do prázdného místa, které postupně zaplní [38, 42].

V případě našeho testování v tkáňové laboratoři, byl zvolen postup vytvoření umělé rány prostřednictvím insertů s přesně definovanou velikostí (500  $\mu\text{m}$ ), jak je možné vidět na obrázku 22. Princip spočívá v nasazení buněk do obou jamek v inzertu. Po jeho odstranění, je možné sledovat buněčnou migraci po vzorcích materiálu do středu vytvořené rány [43, 44].



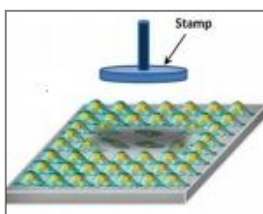
**Obr. 21: Test pomocí zóny vyloučení buněk - Zátka [39]**



**Obr. 22: Insert, firma Ibidi [44]**

### 5.5.3 Stlačovací test pomocí razítka

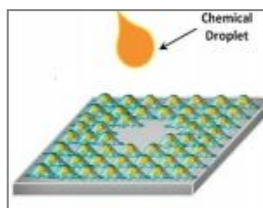
Tato metoda, je založena na principu stlačení souvislé vrstvy buněk, na podkladu pomocí razítka. Po stlačení dojde k vytvoření určitého vzoru na vrstvě buněk, který je totožný s tvarem razítka. Výhodou tohoto testu, je vytvoření umělé rány s libovolným tvarem a studiem migrace buněk v přítomnosti buněčných zbytků, jak je možné vidět na obrázku 23 [39].



**Obr. 23: Stlačovací test pomocí razítka [39]**

#### 5.5.4 Působení chemikálií

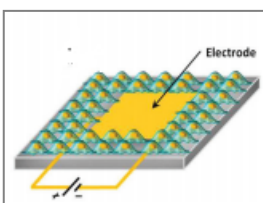
Na souvislé vrstvě buněk na podkladu, může být vytvořena umělá rána také prostřednictvím působením chemikálií. Jednat se může např. o hydroxid sodný, který se aplikuje na buňky. Buňky se při kontaktu s hydroxidem rozloží a vytvoří model rány, který je znázorněn na obrázku 24. Velikost rány je řízená objemem aplikované chemikálie [39].



**Obr. 24: Působení chemikálií [39]**

#### 5.5.5 Snímání elektrické impedance buněk

Tato metoda využívá elektrické signály jak k vytvoření rány, tak ke sledování procesu hojení (viz obr. 25). Buňky, které dosahují v kultivační nádobě konfluence 80%, se dostávají do kontaktu s elektrodou, která naruší buněčnou vrstvu a vytvoří tak dobře definované prázdné pole. Prostřednictvím elektrod, které jsou umístěny na dvě jamky, je pak možné snímat zaplňování prázdného pole. Zvyšující elektrický odpor, který je možné měřit, vzniká na základě migrace buněk, které postupně narůstají na elektrodu [40, 43].



**Obr. 25: Snímání elektrické impedance buněk [39]**



### III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavním cílem experimentální části, bylo biologické testování námi vybraných materiálů, konkrétně se jednalo o nanovláknennou vrstvu vyrobenou z polykaprolaktonu (PCL) a komerčně dostupný materiál XeDerma®. Tato testování proběhlo proto, abychom zjistili, zda je polykaprolakton vhodný k využití v regenerativní medicíně pro léčbu kožních poranění. XeDerma® se již v určitých případech pro léčbu kožních ran používá, a proto byla použita jako materiál referenční. Pro biologickou analýzu vláknenných materiálů byl použit MTT test, elektronová a fluorescenční mikroskopie. Při *in vitro* testování, byla prostřednictvím insertu o přesně definované velikosti (500  $\mu\text{m}$ ) vytvořena umělá rána a během testovacích dnů, byla sledována buněčná migrace po vzorcích materiálu do středu vytvořené rány. *In vitro* testování se zabývalo také buněčnou adhezí a proliferací a nelze opomenout biologické testování použitých materiálů PCL a XeDerm®.

## 6 Použitý materiál

### 6.1 Biologické testování *in vitro*

- Buňky: 3T3 myší fibroblasty ATCC
- Médium: DMEM (Dubelco's modified Eagle's medium) Lonza
- Inzert Ibidi

#### 6.1.1 Použité chemikálie

- ATB antibiotika: Lonza  
Penicillin - Streptomycin - Amphotericin B
- BSA (hovězí sérový albumin) VWR
- DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) Sigma - Aldrich
- Ethanol Penta
- FBS (fetální telecí sérum) Biosera
- Fluoroshield™ with DAPI Sigma - Aldrich
- Glutaraldehyd Sigma - Aldrich
- HCl Penta
- IPA (isopropylalkohol) Penta
- KCl Analytika
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Analytika
- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) Amresco
- NaCl Analytika
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Analytika
- Methanol Penta

- Phalloidin - FITC Sigma - Aldrich
- PI (propidium jodid) Sigma - Aldrich
- Triton™ X-100 Sigma - Aldrich
- Trypsin Biosera

### 6.1.2 Použité roztoky

- **DAPI:** smíchání 1μl zásobního roztoku DAPI v 1ml PBS
- **DMEM, kultivační médium:** smíchání 90 ml DMEM, 10 ml FBS a 1 ml antibiotik (Penicillin - Streptomycin - Amphotericin B), práce ve sterilním prostředí, skladování při 4 °C, doba použitelnosti je jeden týden
- **Glutaraldehyd:** 2,5% roztok glutaraldehydu v PBS
- **Okyselený isopropanol:** k 50 ml IPA přidat 20 μl 35 % HCl. Výsledné pH roztoku je 1. Skladování při pokojové teplotě
- **PBS, fosfátový pufr:** smíchání 800 ml destilované vody, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rozpustit mícháním, úprava pH = 7,4 a doplnit do celkového objemu 1 l destilovanou vodou, sterilizace v autoklávu, skladování při pokojové teplotě
- **Propidium jodid:** smíchání 50 μl PI s 10 ml PBS, skladování v temnu při 4 °C
- **Phalloidin - FITC:** smíchání 1μl zásobního roztoku Phalloidin-FITC v 1ml PBS
- **MTT:** rozpuštění 0,1 g MTT v 50 ml PBS, skladování v temnu při 4 °C

### 6.2 Použité přístroje a programy

- Cirkulovaná digitální vodní lázeň - LabTech
- CO<sub>2</sub> inkubátor - NB-203XL, N-Biotek
- Flow box - bio II Advance, TelStar
- Invertorový fluorescenční mikroskop - Eclipse Ti Nikon
- LUNA Cell Counter - model L10001, Logos Biosystems

- NIS Elements AR
- Program pro statistické zpracování dat - Statistica 12
- Rastrovací elektronový mikroskop - TESCAN VEGA TS 5130
- Software pro měření průměru vláken - NIS Elements AR
- Spektrofotometr – BioTek ELX 808
- Zlatička Q150R - Quorum

## **7 Principy použitých *in vitro* testovacích metod**

V následující kapitole budou popsány principy metod, které byly využity při biologickém testování *in vitro*.

### **7.1 MTT test**

Metoda MTT testu spočívá v redukci žlutého rozpustného 3 [4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (fialové krystalky hvězdicového tvaru). K reakci dochází na mitochondriální membráně živých buněk a k rozpuštění formazanu dojde po přidání silného detergentu, v našem případě se jedná o okyselený isopropanol. Zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnových délkách 570 a 650 nm (vlnová délka pozadí). Důležité je zmínit, že hodnota absorbance odpovídá množství živých buněk a jejich fyziologii, čím tmavší barva roztoku je, tím je vyšší absorbance, a také vyšší metabolická aktivita (viabilita) buněk.

### **7.2 Elektronová mikroskopie**

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) funguje na principu dopadu tenkého svazku elektronů na testovaný vzorek. Tento tenký svazek elektronů dopadá postupně na všechna místa vzorku. Primární svazek elektronů se v podstatě pohybuje po vzorku řádek po řádku pomocí elektromagnetického vinutí a vyrazí elektrony sekundární. Sekundární elektrony jsou přijímány detektorem a jsou převedeny na videosignál. Výsledný ostrý obraz povrchu vzorku se vytváří postupným skenováním a je zobrazován na monitoru počítače. Elektronový mikroskop je řízen počítačem a jeho doplňkový software je schopný zaznamenávat a archivovat ve standardním formátu. Prostřednictvím elektronového mikroskopu jsme schopni pozorovat a charakterizovat testované vzorky, které jsou omezeny pouze velikostí vakuové komory, do níž se vzorky vkládají.

### **7.3 Fluorescenční mikroskopie**

Tato metoda je založena na aplikaci fluorescenčních barviv, které po ozáření (excitaci) světlem určité vlnové délky vyzařují (emitují) světlo jiné vlnové délky. Pro zviditelnění molekul a buněk, které nemají schopnost autofluorescence (primární přírodní fluorescence, např. chlorofyl) je nutné využít fluorescenční

látky. Fluorofory je potřeba chránit před intenzivním světlem, ve kterém se tyto látky rozkládají a trvale ztrácejí schopnost fluorescence (tzv. fotovybělování). Některá fluorescenční barviva mají schopnost se sami vázat na buněčné struktury např. propidium jodid (PI) nebo 4',6-diamidin-2-fenilindo (DAPI), která barví DNA. Jiná jsou kovalentně vázaná na látku, která se váže na určitou buněčnou strukturu, např. phalloidin se váže na aktinová filamenta (vlákna) v buňce a fluorescein isothiokyanát (FITC) je fluorescenční barvivo konjugované k phalloidinu.

## **8 Postupy**

### **8.1 Materiál**

Zvlákněné vzorky z polykaprolaktonu (PCL) byly poskytnuty z Katedry netkaných textilií a nanovláknenných materiálů (KTN), na Technické univerzitě v Liberci, kde byly vyrobeny metodou elektrostatického zvláknování na přístroji NanoSpider - NS Production Lines 500 (12 % roztok PCL,  $M_w = 45\,000$ , ve směsi chloroformu, ethanolu a kyseliny octové, v poměru 8:1:1, rychlost zvláknování 50 mm/min). Jako referenční materiál byl použit dermální kožní kryt XeDerma®, což je komerčně dostupný materiál, který byl zakoupen od společnosti Bio Skin, a. s.

Pro testování byly připraveny vzorky o průměru 15 mm, v případě menších vzorků se jednalo o hodnotu 6 mm v průměru. Vzorky (15 mm průměr) byly z materiálu vyříznuty prostřednictvím ostrého trubkového bříty za pomoci mírného tlaku a rotačního pohybu. V případě menších vzorků (6mm průměr) byl materiál umístěn mezi dva papíry. Pomocí dírkovačky byly jednotlivé vzorky vystříhnuty a následně separovány od papíru.

#### **8.1.1 Sterilizace materiálu**

Vzorky byly nejprve sterilizovány v 70 % ethanolu po dobu 30 minut, pak byly přeneseny do sterilních kultivačních destiček a následně byly promyty sterilním PBS. Na takto připravené vzorky byly nasazeny buňky.

V případě nasazení buněk na suché vzorky bylo potřeba přemístit testovaný materiál po jeho sterilizaci (70 % ethanol, 30 min.) na laboratorní Parafilm a ponechat ho ve sterilním boxu vyschnout po dobu několika hodin.

Odlišný postup sterilizace probíhal v případě testování materiálu PCL a referenčního materiálu XeDerma®, kdy byl u referenčního materiálu kladen důraz na testovanou stranu. Ve sterilním boxu, byly jednotlivé vzorky vysvíceny UV zářením po dobu 20 minut a po uplynutí této doby, byly vzorky otočeny na druhou stranu a postup sterilizace probíhal stejně, jako v prvním případě.

### **8.2 Kultivace buněk**

Pro *in vitro* testování byly použity myši 3T3 fibroblasty (ATCC USA), 9-10 pasáž v závislosti na experimentu.

### 8.2.1 Pasážování

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvičkách spolu s médiem DMEM. Kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5% obsahem oxidu uhličitého. Poté, co buňky porostly 80 % dna kultivační nádoby, bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty cca 2 ml PBS pufru. Po odsátí PBS byly k buňkám přidány 2 ml nahřátého trypsinu a kultivační nádoba byla vložena do termostatu o teplotě 37 °C, kde byla ponechána 2 minuty. Dalším krokem byla kontrola buněk pod mikroskopem, zda jsou buňky uvolněné ode dna kultivační lahvičky a v roztoku plavou. Následně bylo přidáno 8 ml nového média DMEM a buňky byly spolu s médiem důkladně resuspendovány. Ze vzniklé suspenze, bylo možné pomocí automatické počítací buněk (LUNA Cell Counter) stanovit množství buněk na 1 ml. Následně byla suspenze buněk rozdělena do nových kultivačních lahviček, přičemž do každé lahvičky bylo navíc přidáno cca 12 až 15 ml média DMEM.

### 8.2.2 Nasazení buněk

Testování probíhalo ve čtyřech testovacích dnech a to 1., 3., 7., a 14. den po započetí experimentu. V případě experimentu, kdy byl u referenčního materiálu kladen důraz na stranu, na kterou budou buňky nasazeny, bylo testování zkráceno a končilo 10. testovací den. V tomto případě byly testovací dny stanoveny na 1., 3., 6. a 10 den po započetí experimentu. Při *in vitro* testování uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů (suchý vysterilizovaný materiál) probíhalo testování po dobu 72 hodin. Testování bylo stanoveno na 0 hod., 24 hod. 48 hod. a 72 hod.

Vysterilizované vzorky (průměr 15 mm) byly přendány do jamek sterilní 24 jamkové kultivační destičky. Ostatní vzorky (průměr 6 mm) byly přendány do jamek sterilní 96 jamkové destičky. Ke každému vzorku byla přidána buněčná suspenze s požadovaným množstvím zpasážovaných buněk (viz postup 8.2.1). Koncentrace buněk, v případě vzorků o průměru 15 mm byla  $1 \times 10^4$  na 1 ml/jamku, v případě vzorků s průměrem 6 mm, byla koncentrace buněk také  $1 \times 10^4$  na jamku v 200  $\mu$ l objemu média DMEM. V případě vzorků sterilizovaných UV (6 mm v průměru), byla koncentrace buněk  $1 \times 10^3$  na jamku v objemu média 200  $\mu$ l. Následně byly takto připravené vzorky vloženy do inkubátoru a byly uchovány při teplotě 37 °C s 5% obsahem oxidu uhličitého.



### **8.2.3 Výměna média**

Výměna kultivačního média byla prováděna ve sterilním prostředí, podle potřeby, přibližně každé 2 až 3 dny. Z kultivačních jamek, kde byly uloženy testovací vzorky, bylo staré použité médium odsáto a nahrazeno čerstvým médiem DMEM v množství 200  $\mu$ l (vzorek 6 mm průměr) a 1500  $\mu$ l (15 mm průměr). Médium bylo vždy před výměnou zahřáto na teplotu 37 °C.

### **8.3 Měření průměru vláken**

Průměry vláken byly naměřeny v programu NIS Elements AR. Pro všechna měření, byly použity snímky z elektronového mikroskopu o zvětšení 5000x. Po spuštění programu a vybrání vhodného snímku, byla provedena kalibrace. Dále byly měřeny průměry vláken tak, že byl označen začátek a konec úsečky, která stanovovala okraje vlákna. Pro všechna měření jednotlivých vzorků, bylo proměřeno 100 vláken z několika částí z jednoho snímku.

### **8.4 MTT test**

K testování, bylo pro každý testovací den použito 5 vzorků PCL a 5 vzorků referenčního materiálu XeDerma®. V případě experimentu, kdy byl kladen důraz na stranu referenčního materiálu, bylo použito 5 vzorků XeDerma® strana A a 5 vzorků strana B. Pro každý testovací den, byla dále použita jedna negativní kontrola (NC), což je v podstatě kontrola, kdy je vzorek inkubován pouze s médiem bez buněk a 3 jamky kultivační destičky s nasazenými buňkami, ale bez přítomnosti vzorku (pozitivní kontrola, PC).

Všechny testované vzorky, byly ve sterilním prostředí přesunuty do nové sterilní kultivační 96 jamkové destičky. Vzorky byly přesunuty proto, aby se zabránilo sledování viability buněk přisedlých na dně jamky a zkoumaly se pouze buňky, které na vzorcích adherovaly. Do každé jamky s testovaným materiálem, bylo připipetováno 150  $\mu$ l DMEM a 50  $\mu$ l roztoku MTT. Vzorky byly inkubovány v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> po dobu 3 hodin.

Po uplynutí požadované doby 3 hodin, bylo odsáto médium s MTT ze všech vzorků i pozitivních kontrol. K rozpuštění krystalků formazanu, bylo použito 200  $\mu$ l okyseleného isopropanolu, který na vzorky působil 5 minut. Všechny vzorky byly roztokem několikrát opláchnuty, aby se vyplavil rozpuštěný formazan ze struktury

materiálu, a takto vzniklý roztok byl přenesen do nových jamek. Destička s roztoky byla vložena do spektrofotometru, kde bylo provedeno měření absorpance, při vlnové délce 570 a 650 nm.

## **8.5 Příprava vzorků na SEM**

Vzorky byly vyjmuty z kultivačního média a přeneseny do nových kultivačních destiček, kde byly všechny materiály 2x propláchnuty v PBS. Následovalo zafixování propláchnutých vzorků v 2,5% glutaraldehydu, ve kterém byly ponechány po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Po uplynutí doby, která byla potřebná k fixaci, byly vzorky opět 2x opláchnuty v PBS a následně byly promyty, vzrůstající ethanolovou řadou s koncentrací 60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% v deseti minutových intervalech. Takto odvodněné vzorky, byly přeneseny na laboratorní Parafilm, kde byly ponechány k vysušení. Vysušené vzorky byly připevněny oboustrannou lepicí páskou na terčík, a pozlaceny ve zlatičce 7 nm vrstvou zlata.

## **8.6 Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii**

### **Barvení propidium jodidem (PI)**

Veškeré vzorky určené k barvení fluorescenční látkou PI, byly ve sterilním boxu přeneseny do nové destičky. Dále už veškeré práce probíhaly mimo sterilní box. Vzorky byly 2x propláchnuty PBS pufrem a fixovány vymraženým methanolem po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Po uplynutí doby potřebné k fixaci, byly vzorky 3x promyty roztokem PBS. K takto připraveným vzorkům, bylo přidáno 150 µl (15 mm průměr) a 50 µl (6 mm průměr) roztoku propidium jodidu. Práce s fluorescenčním barvivem probíhaly v šeré místnosti. Vzorky byly barveny po dobu 10ti minut při pokojové teplotě a po uplynutí této doby, byly 3x propláchnuty PBS a uchovány v temnu, aby nedošlo k fotovybělování před mikroskopií.

### **Barvení DAPI**

Vzorky byly ve sterilním boxu přeneseny do nové destičky. Další práce a barvení už probíhaly mimo sterilní box. Testované materiály byly 2x propláchnuty PBS pufrem a fixovány vymraženým methanolem po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Následně byl od vzorků odstát methanol a vzorky byly 3x propláchnuty roztokem PBS. Ke každému vzorku bylo přidáno 150 µl (15 mm průměr) a 50 µl (6 mm průměr) fluorescenčního barviva DAPI. Vzorky byly barveny 5 minut

při pokojové teplotě a následně byly 3x opláchnuty PBS a ponechány v šeru a připraveny k mikroskopii.

### **Barvení phalloidinem FITC + DAPI**

Nejprve byly vzorky ve sterilním boxu přeneseny do nové destičky. Dále už práce probíhaly mimo box. Testované vzorky byly dvakrát promyty PBS a fixovány 10 minut při teplotě 4 °C roztokem 2,5 % glutaraldehydu v PBS. Vzorky byly po fixaci 3x propláchnuty roztokem PBS a buňky byly permeabilizovány 0,1% roztokem Tritonu X-100 v 0,1% roztoku BSA v PBS. Ke každému vzorku bylo přidáno 150  $\mu$ l (15 mm průměr) a 50  $\mu$ l (6 mm průměr) tohoto roztoku a vzorky byly v roztoku ponechány po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Dále byly vzorky 3x opláchnuty PBS a barveny 150  $\mu$ l (15 mm průměr) a 50  $\mu$ l (6 mm průměr) roztokem phalloidinu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky opět 3x propláchnuty PBS a barveny 150  $\mu$ l (15 mm průměr) a 50  $\mu$ l (6 mm průměr) roztokem DAPI 5 minut při pokojové teplotě. Po obarvení DAPI byly vzorky 3x opláchnuty PBS, a takto obarvené vzorky, byly připraveny k mikroskopii. Fluorescenční barvení probíhalo za šera a připravené vzorky byly před mikroskopií ponechány v šeru.

## **IV. Výsledky a diskuze**

### **9 Testování uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů**

Tento experiment je možné charakterizovat jako pokus, kde byla uměle vytvořena rána prostřednictvím inzertů s přesně definovanou velikostí (500  $\mu\text{m}$ ). Na dno 24jamkové kultivační destičky, byl vložen námi studovaný materiál (15 mm v průměru), na který jsme umístili inzert, který je z jedné strany lepkavý a měl by tak přilnout k materiálu. Do obou jamek v inzertu byly nasazeny buňky o určité koncentraci. V následujících testovacích dnech, byla sledována buněčná migrace po vzorcích materiálu do středu vytvořené rány. Pro účely této práce, byla buněčná migrace testována také na dně Petriho misky, aby bylo možné zjistit, zda se tato metoda jeví jako vhodná k vytvoření umělé rány.

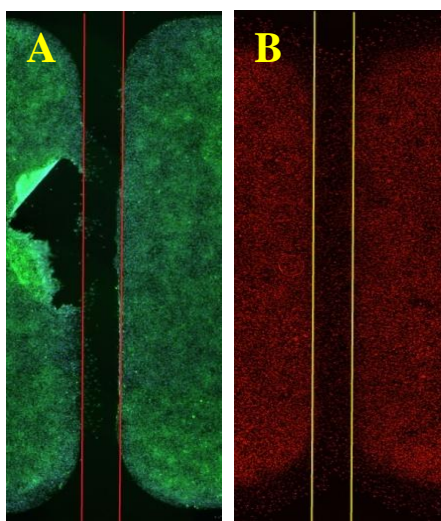
Experiment byl prováděn dohromady dvakrát, vzhledem k prvotním potížím s vlhkostí materiálu po jeho sterilizaci ethanolem a následným promytím sterilním PBS, kde se médium po napipetování do komůrek inzertů na testovaných vzorcích rozteklo do všech stran. Z tohoto důvodu byl experiment opakován s tím, že testované materiály po sterilizaci ethanolem byly ponechány ve sterilním boxu dva dny k vysušení a následně byly inzerty položeny na suché vysterilizované vzorky.

#### **9.1 *In vitro* testování**

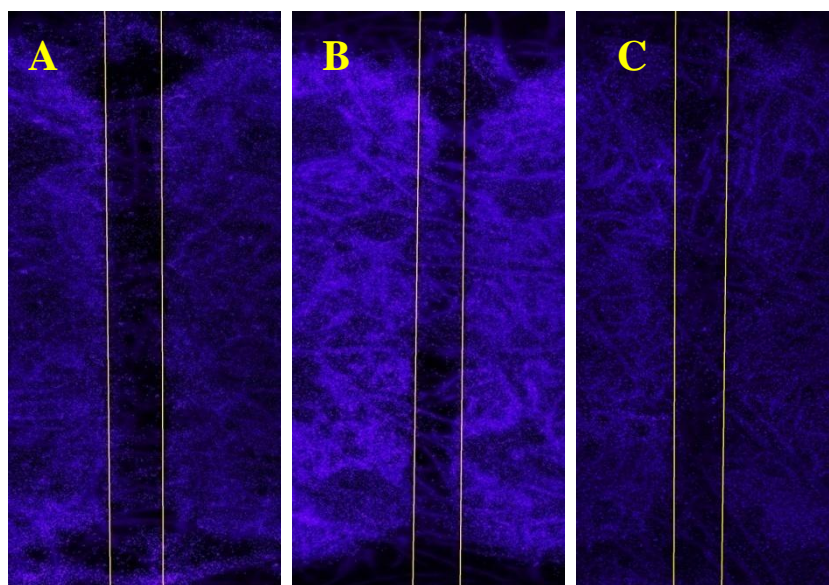
##### **9.1.1 Fluorescenční mikroskopie**

Pro fluorescenční mikroskopii byla buněčná jádra barvena propidium jodidem (PI) a DAPI. Pro barvení aktinových vláken byl využit phalloidin konjugovaný s FITC. Fluorescenční barvení probíhalo dle protokolu (viz 8.6).

### Uměle vytvořená rána (inzert) - experiment č. 1



**Obr. 26: Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena DAPI a aktinová filamenta obarvena Phalloidinem FITC (první snímek), buněčná jádra obarvena propidium jodidem (druhý snímek), snímky složeny v programu Photoshop, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - Petriho miska (1. den), B - Petriho miska (3. den)**

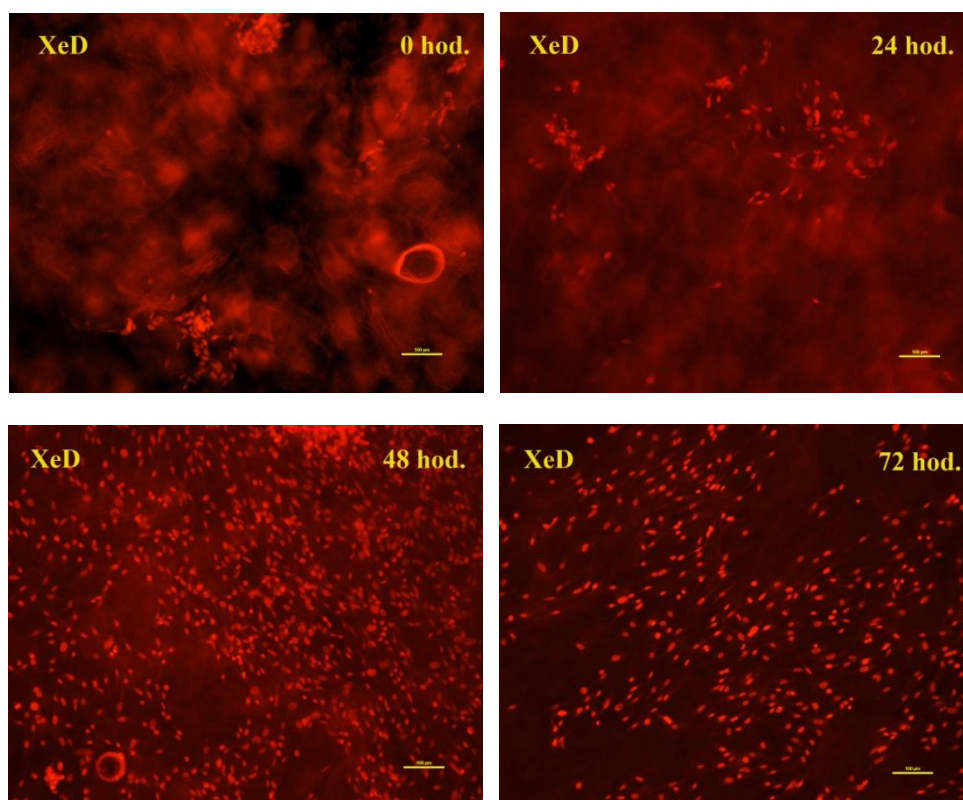


**Obr. 27: Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena DAPI, (snímky složeny v programu Photoshop), tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL (1. den), B - PCL (3. den), C - PCL (7. den)**

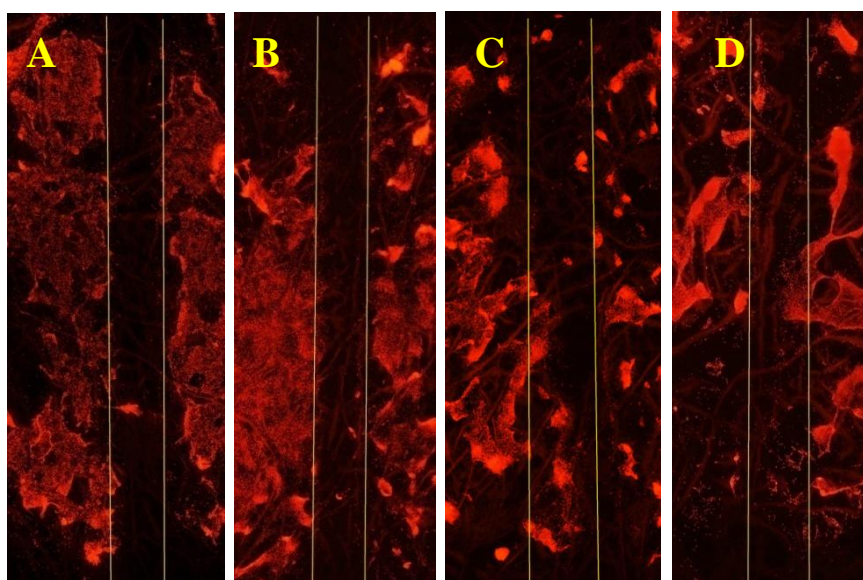
Snímky z prvního testovacího dne (viz obr. 26 a 27) ukazují adhezi buněk v místě jejich nasazení na daný vzorek, tedy obě dvě jamky inzertu. Další snímky z následujících dnů charakterizují buněčnou migraci do středu vytvořené rány na dně Petriho misky a nanovlákněné struktury PCL. Na dně Petriho misky bylo vytvořené prázdné pole třetí den téměř porostlé buňkami. V případě PCL je možné vidět, jak buňky další testovací dny migrují do středu vytvořené rány. Ze snímků je viditelné, že na Petriho misce je rána plně vyplněna buňkami již 3. den po nasazení, ale u PCL ani 7. testovací den koncentrace buněk ve středu rány není srovnatelná s Petriho miskou. V případě referenčního materiálu XeDerma® nebylo možné použít snímky z fluorescenční mikroskopie, protože se bohužel ukázalo, že míra adheze buněk na tomto materiálu je velmi nízká. V případě tohoto materiálu se bohužel se nepodařilo zachytit ani jeden ilustrativní obrázek.

Tento experiment byl opakován ještě jednou s tím, že byl pozměněný postup při přípravě vzorků. Také byla zkrácena doba testování, které namísto klasických testovacích dnů probíhala v řádech několika hodin. Dobu testování jsme zkrátili především proto, abychom lépe zachytili migraci buněk do středu rány. Jak již bylo zmíněno výše, příprava vzorků konkrétně jejich sterilizace, byla pozměněna vzhledem k faktu, že vysterilizovaný vlhký materiál je nevhodný pro nalepení inzertů. Inzerty nebyly schopny k vlhkému materiálu dokonale přilnout a médium s buňkami se tak rozteklo na jednotlivých vzorcích do všech stran. V dalším experimentu byly inzerty tedy položeny, na suchý vysterilizovaný materiál.

## Uměle vytvořená rána (inzert) - experiment č. 2



**Obr. 28:** Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 10 µm: XeDerma® (0 hod., 24 hod., 48., 72. hod.)



**Obr. 29:** Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena propidium jodidem, snímky složeny v programu Photoshop, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL (0 hod.), B - (24 hod.), C - (48 hod.), D - (72 hod.)

Ze snímků (viz obr. 29) zachycující PCL materiál, které byly nafoceny bezprostředně po nasazení buněk na suchý vysterilizovaný materiál, je vidět adheze buněk v místě nasazení do obou jamek inzertů. Ze snímků jsou viditelné shluky buněk, které postupně během dalších testovacích hodin migrují do středu vytvořené rány. V případě dermálního kožního krytu XeDerma® buňky na tomto materiálu špatně rostly stejně jako v prvním experimentu, proto byly použity pouze ilustrativní snímky (viz obr. 28), které zachytily místa na vzorku, kde se buňky vyskytovaly. Nicméně je z tohoto experimentu patrné, že ani na suché sterilní vzorky se inzerty vhodně nenalepí, což zkresluje vyhodnocení experimentu.

Z výsledků fluorescenční mikroskopie vyplývá, že adhezi a migraci buněk do středu vytvořené rány více podporuje nanovlákná struktura PCL, oproti komerčně dostupnému kožnímu krytu XeDerma®. Vzhledem k nepříznivým výsledkům v případě referenčního materiálu, byly prováděny další dva experimenty, kde byl testovaný samotný referenční materiál XeDerma® spolu s nanovláknou strukturou PCL.



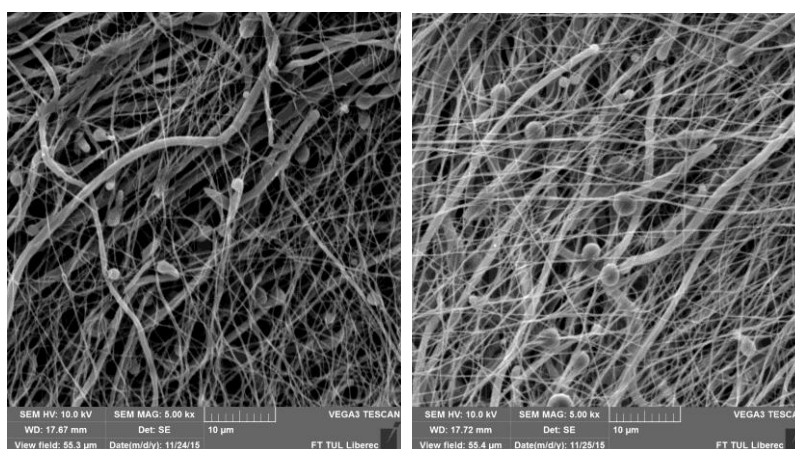
## 10 Testování nanovláknenné struktury PCL a referenčního materiálu XeDerma®

Tento experiment byl zaměřen na testování nanovláknenné struktury z PCL a dermálního kožního krytu XeDerma®, který byl použit jako materiál referenční. Testování těchto materiálů proběhlo na základě toho, že buňky na referenčním materiálu oproti PCL hůře rostly. Experiment, při kterém byly použity námi studované materiály, byl prováděn celkem dvakrát. Při druhém testování byl brán u materiálů XeDerma® zřetel na stranu, na kterou se buňky nasazují. Z tohoto důvodu bylo nutné, už při přípravě vzorků oddělit stranu A od strany B. Z testování bylo pak možné odvodit, která strana je pro růst buněk vhodnější.

### 10.1 Morfologická analýza vláken

Veškeré hodnoty naměřené v programu NIS Elements, byly importovány do programu M. Excel, kde byly dále zpracovávány.

#### PCL a XeDerma® strana A a B - experiment č. 2

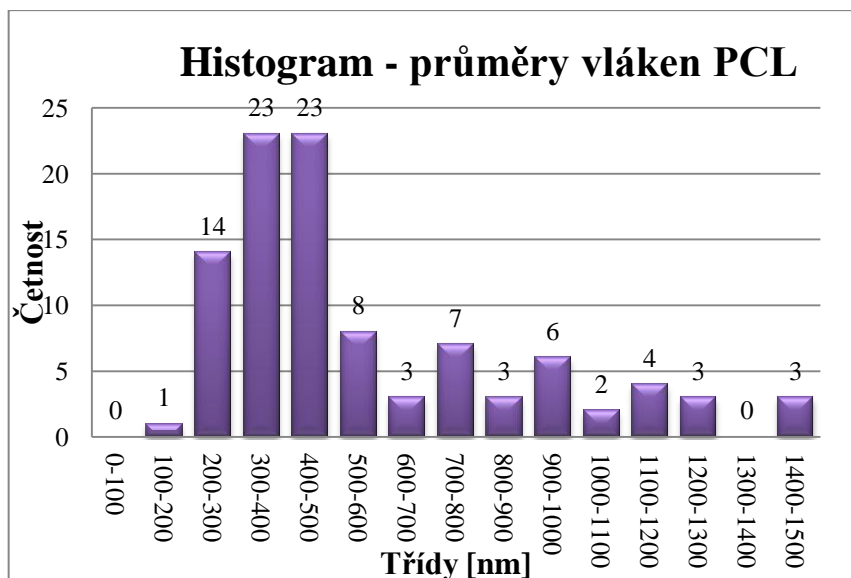


Obr. 30: Snímky SEM materiálů PCL z NC, měřítko odpovídá 10 µm - materiál PCL, testovací dny (1. den, 10. den)

#### Průměry vláken PCL, 1. testovací den, NC

Průměr [nm]	St. Odchylka [nm]	Minimum [nm]	Maximum [nm]
569,51	322,23	181,16	1581,76

Tab. 1: Naměřené hodnoty průměrů vláken, PCL, 1. testovací den, NC

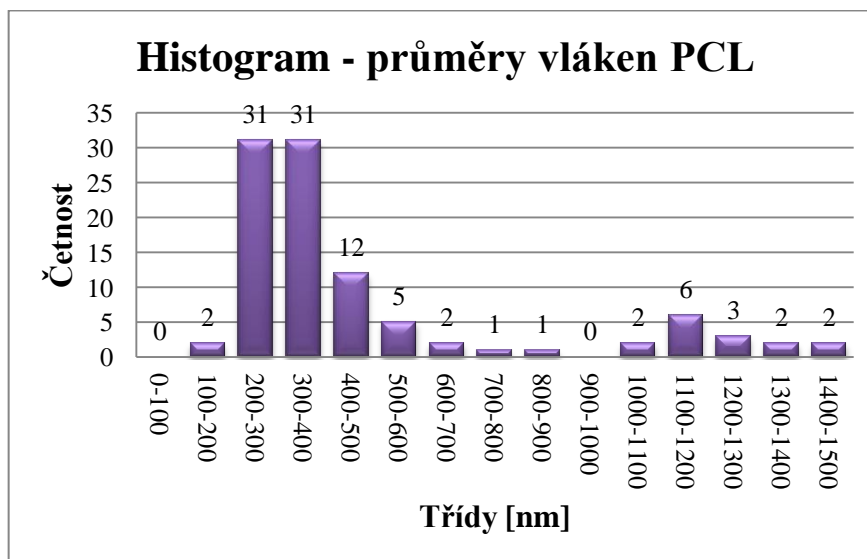


**Graf 1: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken PCL, 1. testovací den, NC**

**Průměry vláken PCL, 10. testovací den, NC**

Průměr [nm]	St. Odchylka [nm]	Minimum [nm]	Maximum [nm]
482,81	328,8	181,38	1483,99

**Tab. 2: Naměřené hodnoty průměrů vláken, PCL, 10. testovací den, NC**



**Graf 2: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken PCL, 10. testovací den, NC**

Při porovnání histogramu z 1. testovací dne (NC) s histogramem z 10. testovacího dne (NC), je zřejmé, že vzhled histogramů není naprosto

totožný, ale má velice podobný trend. Tato hypotéza je i statisticky podložena. V programu Statistica 12 (jednovýběrový t-test) bylo zjištěno, že na 5% hladině významnosti ( $p = 0,062$ ) se průměry vláken 1. a 10. dne neliší, tzn., že manipulace s materiálem při testování nemá vliv na průměry vláken, a z tohoto hlediska se naše materiály nemění.

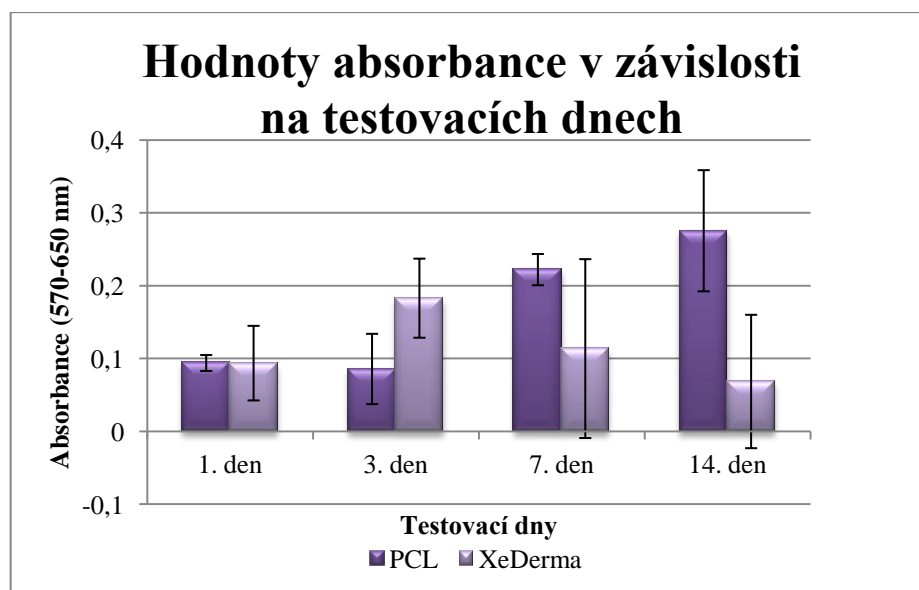
## 10.2 *In vitro* testování

### 10.2.1 MTT TEST

Veškeré naměřené hodnoty absorbance při 570 a 650 nm u testovaných vzorků, byly po naměření importovány do programu Microsoft Excel, kde byly dále zpracovány. Zpracování dat a tvorba grafů probíhala v programu M. Excel. Naměřené hodnoty absorbance, byly od sebe odečteny, a z těchto hodnot, byl vypočítán průměr se směrodatnou odchylkou a hodnoty byly vneseny do grafu.

#### PCL a XeDerma® - experiment č. 1

Na následujícím grafu (Graf 3) jsou vyobrazeny hodnoty absorbancí jednotlivých materiálů (PCL, XeDerma®), v závislosti na testovacích dnech. Pro znázornění výsledků, byl použit sloupcový graf s chybovými úsečkami (výběrové směrodatné odchylky).

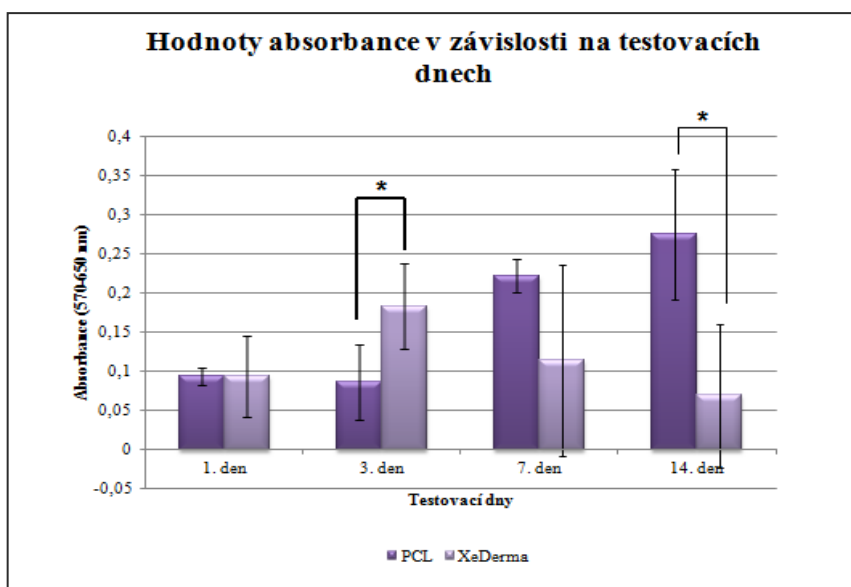


**Graf 3: Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech**

Z grafu 3 můžeme sledovat určitý nárůst absorbance během jednotlivých testovacích dnů, což odráží nárůst množství buněk a jejich viabilitu na PCL a XeDerma®. Vyšší míra absorbance je jasně viditelná u materiálu PCL, je to dáno pravděpodobně jeho nanovláknitou strukturou, která je schopná výrazně podporovat buněčnou adhezi a proliferaci.

Míra buněčné adheze je u obou materiálů srovnatelná. U PCL došlo během 14dnů v rámci testování k nárůstu metabolické aktivity, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena poslední, tedy 14. testovací den. Naopak u materiálu XeDerma® došlo během tří testovacích dnů sice k nárůstu metabolické aktivity, tato aktivita však sedmý testovací den začala klesat a 14. den vykazovala nejnižší hodnotu v rámci celého testování. Tato skutečnost může být dána pravděpodobně samotným materiálem XeDerma®, na kterém buňky nechtějí tolik proliferovat, jako v případě nanovláknité struktury PCL. Nicméně z vysokých hodnot směrodatných odchylek u materiálu XeDerma® je také zřejmé, že vzorky byly velmi nehomogenně porostlé buňkami. Na základě těchto výsledků, vznikla hypotéza, že by buňky mohly preferovat proliferaci pouze na jedné ze dvou stran tohoto materiálu. Proto byl proveden experiment č. 2, který je popsán níže.

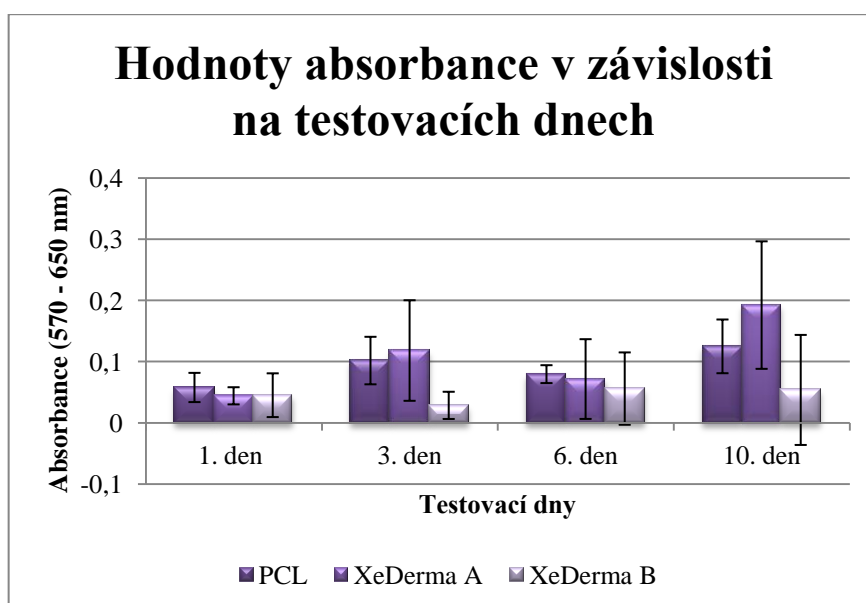
Ve statistickém programu Statistica 12 (jednovýběrový t-test) bylo statisticky zjištěno, že materiály (naměřené absorbance) se na 5% hladině významnosti liší 3. a 14. testovací den ( $p < 0,05$ ). Toto statistické tvrzení je znázorněno v grafu 4.



**Graf 4: Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech. Hvězdičky zobrazujú statisticky významnou odlišnosť naměřených absorbancií 3. a 14. den ( $p < 0,05$ )**

#### **PCL a XeDerma® strana A a B - experiment č. 2**

Na následujícím grafu (Graf 4) jsou vyobrazeny jednotlivé materiály (PCL a XeD s ohledem na testovanou stranu A a B) a jejich hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech.



**Graf 5: Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech**

Z grafu 4 je patrný nárůst metabolické aktivity u PCL a XeDerma® A, což odráží množství buněk na obou dvou testovaných materiálech. U PCL nedošlo během 14ti dnů v rámci testování k takovému nárůstu metabolické aktivity, jako v případě předchozího experimentu (viz PCL a XeDerma® - experiment č. 1) Během 14testovacích dní hodnoty absorbance obou materiálů (PCL a XeDerma A) opět vzrostly. Míra adheze buněk na všechny tři typy materiálů byla srovnatelná. Dle výsledků MTT testu je patrné, že i když buňky na XeDerma® B adherovaly obdobně jako na ostatní dva materiály, v následujících testovacích dnech neproliferovaly. Vysoké hodnoty směrodatných odchylek ukazují, stejně jako u předchozího experimentu, na velmi nehomogenní nárůst buněk na jednotlivých vzorcích. Zarážející je i výsledek posledního experimentu, kdy buňky v rámci testovacích dní výrazně neproliferovaly ani na materiálu PCL.

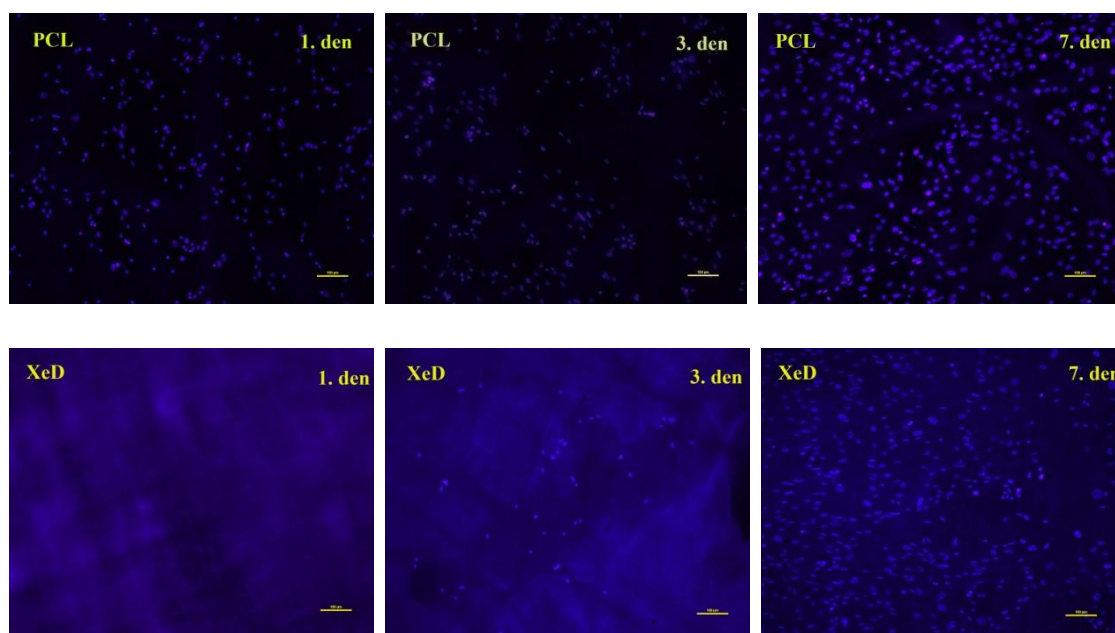
Nicméně lze říci, že při porovnání strany A se stranou B referenčního materiálu XeDerma®, byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance v rámci 14denního testování u strany A. Toto tvrzení dokládá graf 4. Z výsledků MTT, tedy lze považovat stranu A oproti straně B jako vhodnější pro účely naší práce.

Tvrzení, že míra adheze buněk na všechny tři typy materiálů byla srovnatelná, lze statisticky podložit. Na 5% hladině významnosti se materiály (naměřené absorbance) neliší (vypočítáno v programu Statistica 12, ANOVA).

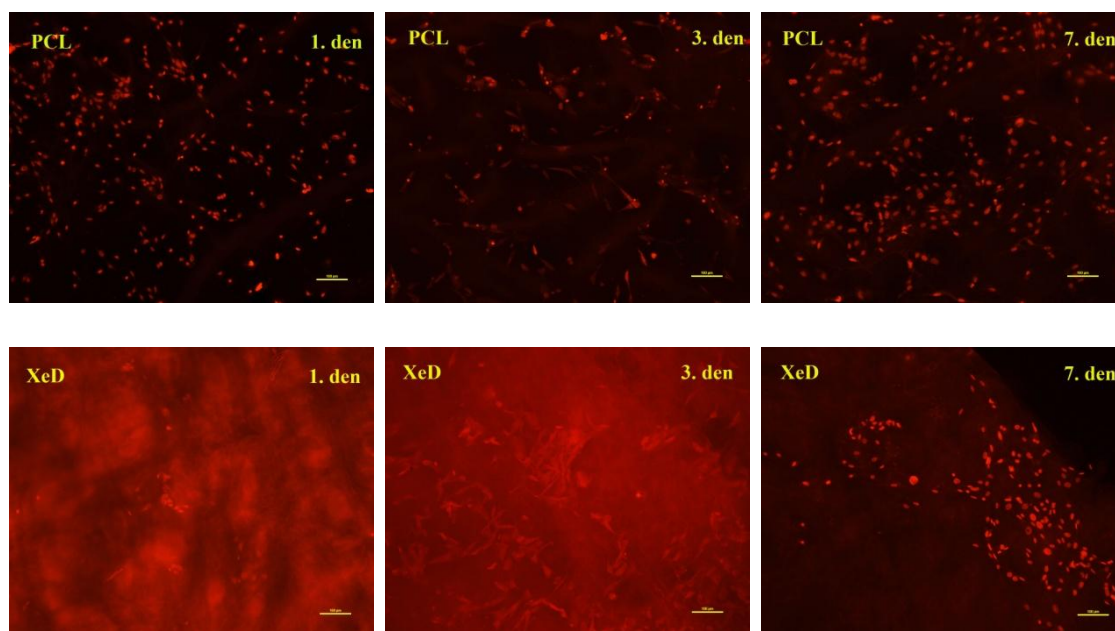
### **10.2.2 Fluorescenční mikroskopie**

Pro fluorescenční mikroskopii, byly vzorky použitých materiálů barveny pomocí DAPI a propidium jodidu (PI) dle protokolu (viz 8.6).

## PCL a XeDerma® - experiment č. 1



**Obr. 31:** Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených DAPI, měřítko odpovídá 100 μm - řádky: materiál (PCL, XeDerma®), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den)



**Obr. 32:** Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 100 μm - řádky: materiál (PCL, XeDerma®), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den)

Snímky z prvního testovacího dne (viz obr. 31 a 32) ukazují adhezi buněk po nasazení na testované materiály. V případě referenčního materiálu XeDerma® (1. testovací den) je jasně viditelná nízká míra adheze buněk, oproti PCL, na kterém buňky adherují ve větším množství již první testovací den.

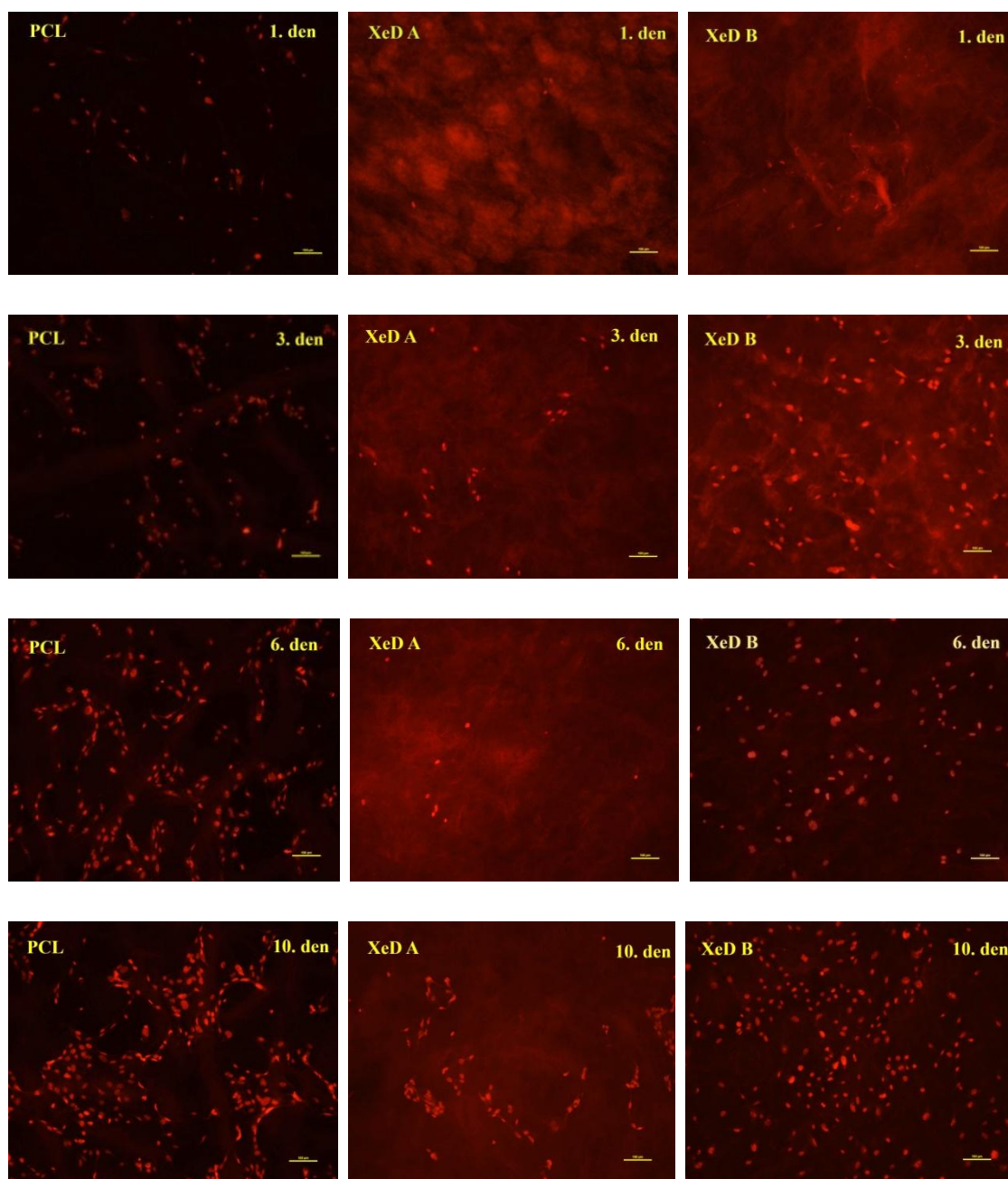
Další snímky z následujících testovacích dnů (viz obr. 31 a 32) charakterizují buněčnou proliferaci na jednotlivých materiálech. Podle předpokladů z předchozího testování vykazoval referenční materiál oproti materiálu PCL menší míru proliferace. Dá se říci, že buňky na XeDermě® první tři dny téměř nerostly. Naopak nanovlákná struktura PCL buněčnou proliferaci podporuje, což je ze snímků zřejmé. Sedmý testovací den je z výsledků fluorescenční mikroskopie patrné, jak jsou vzorky XeDerma® nehomogenně porostlé buňkami. Vzorek barvený DAPI je 7. testovací den velmi dobře porostlý buňkami, i když v předchozích dnech se na vzorcích skoro žádné buňky nevyskytovaly. Zároveň se ale na vzorcích barvených PI 7. testovací den buňky vyskytují jen ostrůvkovitě a v o hodně menším počtu než na vzorku barveným DAPI. Tento fakt pouze potvrzuje vysoké hodnoty směrodatných odchylek u MTT testu.

Porovnáme-li výsledky z *in vitro* testů mezi sebou, dojdeme k závěru, že výsledky z MTT testu a fluorescenční mikroskopie, které byly získané v rámci 14ti denního testování jsou srovnatelné.

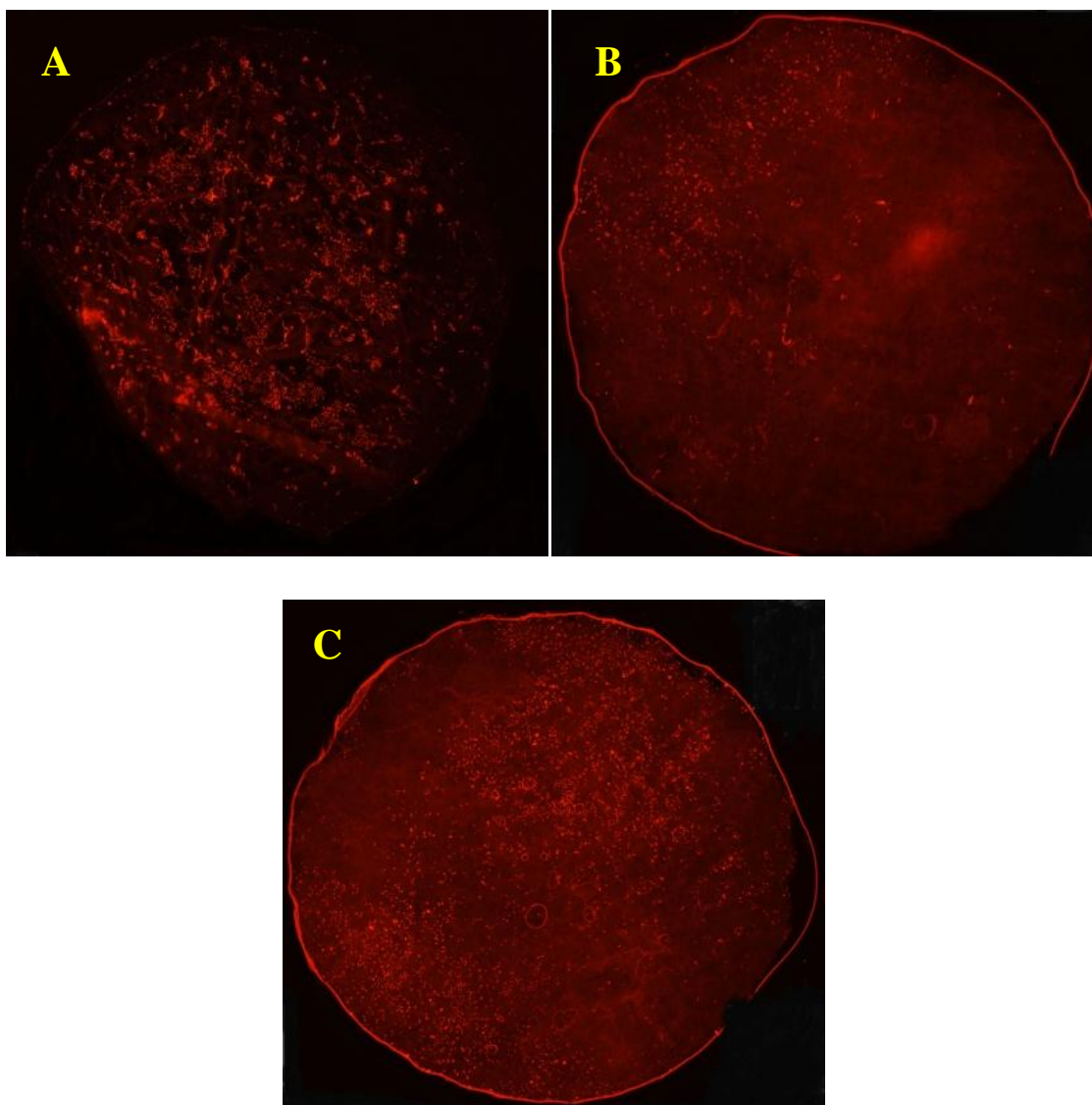
Zároveň z výsledků tohoto experimentu lze usuzovat, že záleží na straně nasazení buněk u materiálu XeDerma®. Proto byl tento experiment opakován vzhledem k referenčnímu materiálu, na kterém buňky vykazovaly malou míru adheze a proliferace. V dalším experimentu byl brán ohled na stranu materiálu XeDerma® na kterou se buňky nasazují.



## PCL a XeDerma® strana A a B - experiment č. 2



**Obr. 33: Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 100 μm - řádky: testovací dny (1. den, 3. den, 6. den, 10. den), sloupce: materiál (PCL, XeDerma® strana A, XeDerma® strana B)**



**Obr. 34: Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem (snímky složeny v programu Photoshop), 10. den testování, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL, B - XeDerma® strana A, C - XeDerma® strana B**

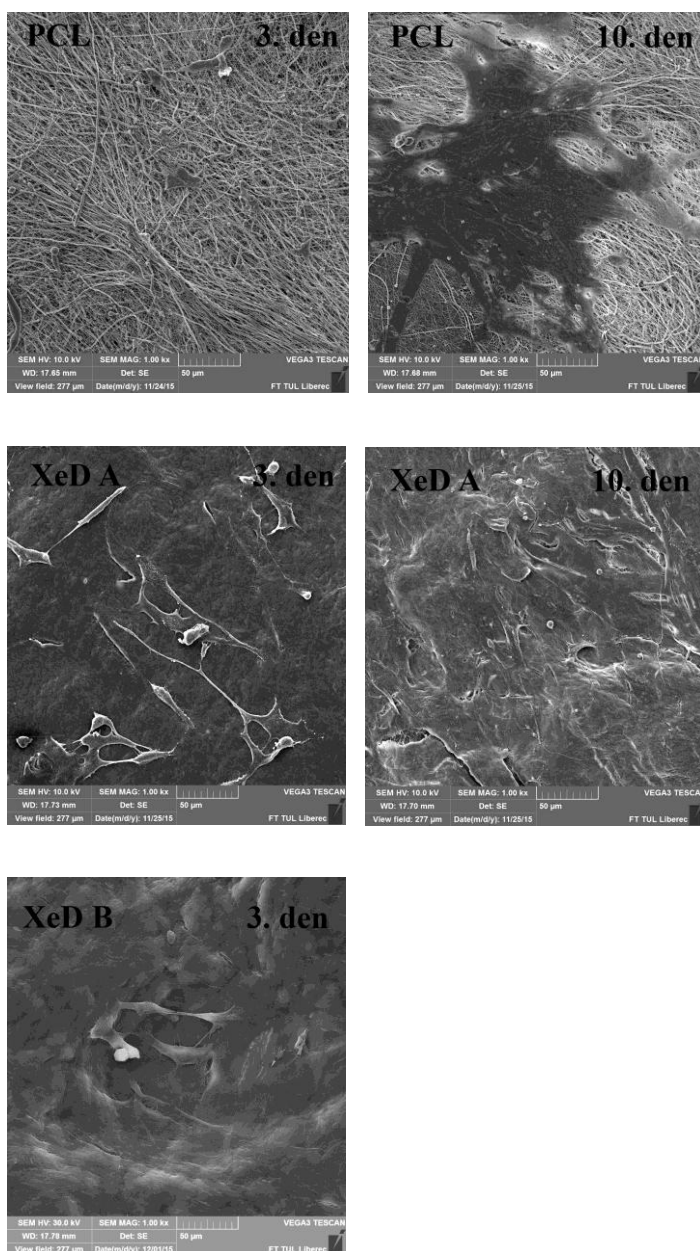
Snímky z prvního testovacího dne (viz obr. 33) dokumentují adhezi buněk po nasazení na testované materiály PCL a XeDerma® stranu A a B. U nanovlákněné struktury PCL (1. testovací den) je jasně viditelná vyšší míra adheze buněk oproti materiálu referenčnímu.

Další snímky (viz obr. 33) z následujících testovacích dnů charakterizují proliferaci buněk na PCL. Podle předpokladu tento materiál vykazoval stejně jako v předchozím experimentu vyšší míru proliferace oproti komerčně dostupný materiál XeDerma®.

Ze snímků zachycujících referenční materiál XeDerma® stranu A a stranu B je zřejmé, že buňky lépe proliferují na straně B. Toto hypotézu potvrzuje i obr. 34 z 10. testovacího dne, který byl složen z jednotlivých snímků v programu Photoshop. Ze snímků je zřejmé, že strana B je mnohem více porostlá buňkami, oproti straně A, na které se buňky vyskytují spíše ostrůvkovitě.

### 10.2.3 SEM

#### PCL a XeDerma® strana A a B - experiment č. 2



**Obr. 35: Snímky SEM, měřítko odpovídá 50 µm - řádky: materiál (PCL, XeDerma® strana A, XeDerma® strana B), sloupce: testovací dny (3. den, 10. den)**

Ze snímků SEM (viz obr. 35) pro materiály PCL a XeDerma® byly vybrány snímky z 1. a 10. testovacího dne. Bohužel v případě materiálu XeDerma® (strana B) nebylo možné snímky z 10. dne nafotit, jelikož jsme buňky na této straně materiálu nenašli.

Snímky SEM v případě nanovlákněné struktury PCL, ukazují oproti materiálu XeDerma® podstatně lepší výsledky ohledně proliferace buněk. Tento výsledek koresponduje s výsledky jak z fluorescenční, tak skenovací elektronové mikroskopie. Na snímcích z třetího testovacího dne jsou v případě materiálu PCL a XeDermy® (strana A) viditelné malé plochy buněčných vrstev. Naopak u materiálu XeDerma® (strana B), není možné pozorovat téměř žádné buňky. Snímky z 10. testovacího dne v případě PCL dokumentují vrstvy buněk zaujímající téměř celou plochu testovaného vzorku. Materiál XeDerma® (strana A) vykazuje 10. testovací den oproti PCL proliferaci buněk v daleko nižší míře. Co se týče strany B materiálu XeDerma® a výsledků z elektronové mikroskopie, lze říci, že se shodují s výsledky z MTT testu, nicméně se rozcházejí s výsledky z fluorescenční mikroskopie.

Pokud shrneme celkové výsledky z *in vitro* testování, dojdeme k závěru, že v případě nanovlákněné struktury PCL se dá říci, že výsledky z MTT testu korespondovaly se snímky z fluorescenční mikroskopie a SEM. Podobně jako v prvním experimentu, buňky na tomto materiálu oproti XeDermě® mnohem lépe adherovaly a zároveň proliferovaly.

V případě kožního krytu XeDerma® nelze porovnat výsledky snímků z fluorescenční mikroskopie (FM) s MTT testem, vzhledem k faktu, že se výsledky rozcházejí. Hodnoty absorbance naměřené pomocí MTT testu nekorespondují se snímky z fluorescenční mikroskopie. Tato skutečnost mohla být způsobena pravděpodobně výběrem jednoho vzorku pro FM i pro SEM. Oproti tomu při MTT testu, bylo těchto vzorků vybíráno 5 od obou materiálů. Z tohoto důvodu, pak mohli při mikroskopii snímky vzniknout takového odchylky. Tento fakt podporuje také námi výše zmíněnou hypotézu, že buňky na vzorky z materiálu XeDerma® adherují velmi nehomogenně.

Z výsledků *in vitro* testů vyplývá, že jako vhodnější materiál pro účely naší práce se jeví materiál vyrobený na Technické univerzitě v Liberci PCL, oproti referenčnímu materiálu XeDerma®, který je na trhu komerčně dostupný.

## V. Závěr

Cílem této práce bylo *in vitro* testování vlákných materiálů, tak aby bylo možné určit, zda jsou tyto materiály vhodné k využití v regenerativní medicíně jako kandidáti tkáňových nosičů pro léčbu kožních poranění. V této práci byly zkoumány dohromady dva materiály. Jednalo se o nanovláknennou strukturu PCL a referenční materiál XeDerma®, což je dermální kožní kryt z decelularizované prasečí kůže, který je již komerčně dostupný a v určitých diagnózách indikovaný

Jako první byl prováděn experiment, kde byla uměle vytvořená rána prostřednictvím inzertů s přesně definovanou šířkou (500  $\mu\text{m}$ ). Tento experiment byl prováděn celkem dvakrát, jelikož došlo k potížím s vlhkostí materiálu po jeho sterilizaci ethanolem a následným promytím sterilním PBS, kde se médium s buněčnou suspenzí na vzorcích rozteklo do všech stran a nedošlo k vytvoření přesně definované rány. Vzhledem k uvedeným potížím, byl experiment opakován s tím, že testované vzorky byly po sterilizaci ethanolem ponechány dva dny se sterilním boxu k jejich vysušení. Na vysušené vzorky pak bylo možné položit inzerty.

Z prvního testování je patrné, že metoda, kdy je na Petriho misce uměle vytvořená rána prostředním inzertů, funguje, ale z výsledků fluorescenční mikroskopie (FM) je zřejmé, že tato metoda není příliš vhodná na materiály, protože inzerty k materiálům špatně přilínají, a tím se nevytvoří přesně definovaná rána. Dochází k pronikání buněk i do jejího středu a nelze tak sledovat zavírání rány.

Z druhého testování, jehož výsledky v podstatě korespondují s výsledky z prvního testování, vyplývá, že inzerty nelze vhodně nalepit na vlhký, ale ani na suchý vysterilizovaný materiál, a tato skutečnost zkresluje vyhodnocení obou experimentů. Nicméně z výsledků FM je zřejmé, že buňky lépe prosperovaly v obou případech na nanovláknenné struktuře PCL oproti referenčnímu materiálu XeDerma®, kde buňky téměř nerostly. Z výsledků je tedy zřejmé, že materiál XeDerma® se nejvíce jeví jako vhodný referenční materiál pro naše *in vitro* experimenty a pro další experimenty s inzerty by proto jako kontrola mohla posloužit Petriho miska, na které buňky velmi dobře proliferují. Na základě těchto skutečností, došla tato práce k závěru, že by bylo vhodné otestovat samotné materiály, aby bylo možné zjistit, jak buňky na tyto materiály podporují buněčnou adhezi a proliferaci.

Druhý experiment, při kterém byly testovány námi studované materiály byl prováděn také dvakrát, stejně jako v předchozím případě. Při druhém testování byl brán

u materiálu XeDerma® zřetel na stranu, na kterou se buňky nasazují, tak aby bylo možné zjistit, na které straně buňky lépe prosperují. Z tohoto důvodu, byly jednotlivé vzorky při přípravě materiálu odděleny na stranu A a stranu B.

Podle předpokladů z předchozího testování a na základě výsledků *in vitro* testů (MTT test a fluorescenční mikroskopie), byla potvrzena hypotéza, že nanovlákná struktura PCL vykazuje oproti referenčnímu materiálu daleko větší míru buněčné adheze a proliferace.

V případě testování PCL a materiálu XeDerma® (strana A a B), výsledky fluorescenční a elektronové mikroskopie dokládají, že PCL opět vykazuje oproti referenčnímu materiálu XeDerma® lepší výsledky ohledně podpory buněčné adheze a proliferace, což se již nedá říct o výsledcích MTT testu, který v rámci tohoto experimentu byl neprokazatelný. V případě referenčního materiálu (strana A a B) nelze s přesností říci, která strana je pro účely naší práce vhodnější, jelikož výsledky MTT testu, fluorescenční a elektronové mikroskopie spolu v případě tohoto materiálu nekorespondují.

Z celkových výsledků *in vitro* testů obou dvou experimentů tedy vyplývá, že nanovlákná struktura PCL vyrobená na Technické univerzitě v Liberci buněčnou proliferaci oproti komerčně dostupnému kožnímu krytu XeDerma® podporuje. Je tedy zřejmé, že materiál PCL vykazuje v případě budoucího využití v regenerativní medicíně při léčbě kožních poranění daleko lepší výsledky, než komerčně dostupný materiál XeDerma®. I přestože PCL vykazuje lepší výsledky oproti materiálu referenčnímu, bylo by vhodné tento experiment v budoucnu znovu zopakovat, vzhledem k tomu, že při posledním testování buňky ani na PCL nerostly alespoň tak dobře, jako při předchozím testování. V rámci této práce na zopakování experimentu již nevyzbyl čas, mohlo by se tedy jednat o budoucí postup v rámci tohoto experimentu. Pro další budoucí experimenty by bylo vhodné optimalizovat metodu „wound healing assay“ (viz kapitola 5.5) tak, aby ji bylo vhodné aplikovat i na materiály.

## Seznam použitých zdrojů

- [1] AMLER, E. a kol. *Lékařské textilie, 1. díl*. Praha: Ústav experimentální medicíny AV ČR, 1. vydání, 2008
- [2] LUKÁŠ, D a kol. *Lékařské textilie, 2. díl*. Praha: Asociace inovačního podnikání ČR, 1. vydání, 2008
- [3] *Současná strategie přípravy trojrozměrných nosičů metodou elektrospiningu: sborník k workshopu*. OrganoNET [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 10. květen 2015]. Dostupné z: [http://organonet.med.muni.cz/media/62508/vy\\_02.pdf](http://organonet.med.muni.cz/media/62508/vy_02.pdf)
- [4] HONG, J. K. and KWON, S. M. Application of tissue engineering in stem cell therapy. *Journal of biomedical science and engineering* [online]. Herndon, VA: Scientific Research Pub, 2014, č. 7, s. 67-74 [cit. 11. květen 2015]. ISSN: 1937-6871. Dostupné z: [file:///C:/Users/Don%20Silver/Desktop/JBiSE\\_2014021910120770.pdf](file:///C:/Users/Don%20Silver/Desktop/JBiSE_2014021910120770.pdf)
- [5] BROWN, P. and STEVENS, J. *Manofibers and nanotechnology in textiles*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1. vydání, 2007. ISBN: 978- 184-569-1059
- [6] O'BRIAN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* [online]. Kidlington: Elsevier Science Ltd, 2011, s. 88-95 [cit. 11. červenec 2015]. ISSN: 1873-4103. Dostupné z: [http://ac.els-cdn.com/S136970211170058X/1-s2.0-S136970211170058Xmain.pdf?\\_tid=ca5ffae8-7a7c-11e5-956200000aabb0f01&acdnat=1445711389\\_ea58bcbeac5af2ded6b03d5e9e9030a6](http://ac.els-cdn.com/S136970211170058X/1-s2.0-S136970211170058Xmain.pdf?_tid=ca5ffae8-7a7c-11e5-956200000aabb0f01&acdnat=1445711389_ea58bcbeac5af2ded6b03d5e9e9030a6)
- [7] KRCHOVÁ, S. a kol. Nanovlákná v hojení kožních ran. *Čes. Dermatovenerol.* Praha: Mladá Fronta, 2014, roč. 4, s. 234-240. ISSN: 1805-0611
- [8] HERMANOVÁ, S. et al. Novel Triazole-based Aluminium Complex for Ring-Opening Polymerization of Lactones. *Polymer Bulletin*. 2011, roč. 67, č. 9, s. 1751-1760. ISSN: 0170- 0839
- [9] ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the cell*. New York: Garland Science, 2002, 4. vydání, ISBN: 10:0-8153-3218-1

- [10] JIRSÁK, O. a KALINOVÁ K. *Skripta netkané textilie – určené pro obor textilní inženýrství*. Liberec: TU v Liberci, 2013, ISBN: 807-08-3746-2
- [11] ERBEN, J. et al. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters*. 2015, 143, s. 172–176, ISSN 0167-577X
- [12] KALINOVÁ, K. *Thermal and chemical technologies of nonwovens production*. TU v Liberci. Part I [online]. [cit. 2. září. 2015]. Dostupné z: <http://www.ft.vslib.cz/depart> 2010  
/knt/web/index.php?option=com\_docman&tas=cat\_view&gid=47&Itemid=36
- [13] DAHIYA, A. *Melt blown technology*. University of Tennessee [online]. 2004 [cit. 2. září. 2015]. Dostupné z: <http://www.engr.utk.edu/mse/Textiles/Melt%20Blown%20Technology.htm>
- [14] WENJING, L., Sun, J. and XINGYU, JJ. Recent advances in electrospinning technology and biomedical applications of electrospun fibers. *Journal of materials chemistry* [online]. 2014, roč. 2, s. 2369-2380 [cit. 5. září 2015]. ISSN: 1364-5501. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/tb/c3tb21478h#!divAbstract>
- [15] PHAM, Q. P., et al. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering* [online]. 2006, roč. 12, č. 5, s. 1197-211 [cit. 12. září 2015]. ISSN: 2152-4947. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/167716342006>
- [16] LUKÁŠ, D., et al. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nanoscale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009, roč. 41, č. 2, s. 59-140, ISSN: 0040-5167
- [17] *Nanofiber technology research group* [online]. [cit. 3. říjen 2015]. <http://faculty.ksu.edu.sa/waheed.almasry/Pages/NanofiberTechnology.aspx>
- [18] Elmarco, *Zařízení Nanospider<sup>TM</sup> pro výrobu nanovláken* [online]. [cit. 10. říjen 2015]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/>



- [19] KYSELÁK, T. *Výroba 3D materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování a metody rapid prototyping*. Liberec, 2014. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Fakulta Textilní. Vedoucí práce Jiří CHVOJKA
- [20] KRŠKA, Z. *Techniky a technologie v chirurgických oborech*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011, 1. vydání, ISBN: 978-80-247-3815-4
- [21] ZAHEDI, P., et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *InterScience*. 2009, roč. 21, č. 2, s. 77-95
- [22] NIPERTOVIÁ, G. a PŘÍKAZSKÁ, M. Vlhké hojení ran a jeho využití v neonatologii. *Pediatr. prax* [online]. 2010, roč. 11, č. 6, s. 258-259 [cit. 15. říjen 2015]. Dostupné z: [http://www.pediatricpreprax.sk/index.php?page=pdf\\_view&pdf\\_id=4770&magazine\\_id=4](http://www.pediatricpreprax.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=4770&magazine_id=4)
- [23] POSPÍŠILOVÁ, A. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky. *Prakt. lékař* [online]. 2010. roč. 6, č. 6, s. 276–281 [cit. 17. říjen 2015]. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2010/06/04.pdf>
- [24] MULDER, M. et al. *Basic principles of wound care*. Cape Town: Pearson Education South Afrika, 2002, 1. vydání, ISBN: 1-8689-1136-5
- [25] BROŽ, L. a kol. Lokální péče při hojení ran po popálení. *Zdravotnictví a medicína* [online]. 2006 [cit. 19. říjen 2015]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/lokalni-pece-pri-hojeni-ran-po-popaleni-173950>
- [26] POSPÍŠILOVÁ, A. Léčba bércových vředů Xe-Dermou. *Dermatol. praxe*. 2009, roč. 3, č. 4, s. 191-194
- [27] *XeDerma* [online]. [cit. 15. listopad 2015]. Dostupné z: <http://www.medicem.com/cs/abu-new-downloads>
- [28] POKORNÁ, A. a MRÁZOVÁ, R. *Kompendium hojení ran pro sestry*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2012, ISBN: 978-80-247-3371-5

- [29] MERKUNOVÁ, A. a OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2008, ISBN: 978-80-247-1521-6
- [30] KITTNAR O. a kol. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011. ISBN: 978-80-247-3068-4
- [31] *Anatomie lidské kůže* [online]. [cit. 23. listopad 2015]. Dostupné na: <http://www.hojeni-ran.cz/anatomie-lidske-kuze>
- [32] ABDELRAHMAN, T. and NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*. 2011, roč. 29, č. 10, s. 491-495, ISSN: 0263-9319
- [33] ATHER, S. and HARDING, K. G. *Wound management and dressing*. Cardiff University, UK: Woodhead Publishing. 2009, ISBN: 978-18-456-9271-1
- [34] PEJZNOCHOVÁ, I. *Lokální ošetřování ran a defektů na kůži*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2010, ISBN: 978-80-247-2682-3
- [35] VYTEJČKOVÁ, R. *Ošetřovatelské postupy v péči o nemocné III*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2015, speciální část ISBN: 978-80-247-9743-4
- [36] POSPÍŠILOVÁ, A. Nové pohledy na hojení a léčbu ran. *Practicus* [online]. 2011, ISSN: 1213-8711. [cit. 11. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://web.practicus.eu/sites/cz/Documents/Practicus-2011-05/27-nove-pohledy-na-hojeni-a-lecbu-ran.pdf>
- [37] ŠAFRÁNKOVÁ, A. a NEJEDLÁ M. *Interní ošetřovatelství I*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2006, ISBN: 80-247-1148-6
- [38] JANÍKOVÁ, E. a ZELENÍKOVÁ R. *Ošetřovatelská péče v chirurgii pro bakalářské a magisterské studium*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2013, ISBN: 978-80-247-4412-4
- [39] RIAHI, R. et al. Advances in Wound-Healing Assays for Probing Collective Cell Migration. *SAGE journals* [online]. 2012, roč. 17, č. 1, s. 59-65 [cit. 13. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://jla.sagepub.com/content/17/1/59.full.pdf+html>

- [40] YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology* [online]. 2004, ISSN: 1472-6750. [cit. 13. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/4/21>
- [41] KOVAŘÍKOVÁ, P. a kol. Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klinická onkologie* [online]. 2014, roč. 27, s. 22-27 [cit. 15. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4472.pdf>
- [42] LIANG CHCH. and GUAN JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Publishing Group* [online]. 2007, roč. 2, č. 2, s. 329-333 [cit. 15. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://web.mnstate.edu/provost/Scratch%20assay%20from%20Nature.pdf>
- [43] *In vitro přístupy k testování migrace buněk: sborník k workshopu*. OrganoNET [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 16. prosinec 2015]. Dostupné z: [http://organonet.med.muni.cz/media/62508/vy\\_02.pdf](http://organonet.med.muni.cz/media/62508/vy_02.pdf)
- [44] *Culture-Insert Family* [online]. [cit. 19. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://ibidi.com/xtpproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-Removable-Chambers/Culture-Insert-Family>

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1:</b> Kmenová buňka vlasového váčku sedící na scaffoldu z PCL nanovláken .....	14
<b>Obr. 2:</b> Princip procesu tkáňového inženýrství .....	15
<b>Obr. 3:</b> PLGA scaffold vyrobený technologií rapid prototyping .....	17
<b>Obr. 4:</b> Nanovláknenný scaffold z elektronové mikroskopie.....	18
<b>Obr. 5:</b> Elektronová mikroskopie fibroblastů v kolagenové pojivové tkáni .....	19
<b>Obr. 6:</b> Schéma Meltblown .....	20
<b>Obr. 7:</b> Schéma tavného extrudéru,.....	21
<b>Obr. 8:</b> Proces Meltblown zvlákňování.....	21
<b>Obr. 9:</b> Schéma obecného procesu elektrostatického zvlákňování z trysky .....	23
<b>Obr. 10:</b> Znázornění proudění polymerního roztoku .....	23
<b>Obr. 11:</b> Zařízení Nanospider™ Production Lines 500 .....	24
<b>Obr. 12:</b> Schéma kombinace uspořádání technologie meltblown v kombinaci s elektrostatickým zvlákňováním a vibračním naprašováním částic .....	24
<b>Obr. 13:</b> Kožní kryt XeDerma®.....	29
<b>Obr. 14:</b> Schéma stavby kůže.....	31
<b>Obr. 15:</b> Fáze zánětlivá .....	34
<b>Obr. 16:</b> Fáze proliferační .....	35
<b>Obr. 17:</b> Granulační fáze .....	35
<b>Obr. 18:</b> Jizva - výsledný stav po zhojení kožní rány .....	35
<b>Obr. 19:</b> Čtyři stádia průběhu "Scratch" testu .....	37
<b>Obr. 20:</b> "Scratch" test.....	37
<b>Obr. 21:</b> Test pomocí zóny vyloučení buněk - Zátka .....	38
<b>Obr. 22:</b> Insert, firma Ibidi .....	38
<b>Obr. 23:</b> Stlačovací test pomocí razítka .....	38
<b>Obr. 24:</b> Působení chemikálií.....	39
<b>Obr. 25:</b> Snímání elektrické impedance buněk .....	39
<b>Obr. 26:</b> Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena DAPI a aktinová filamenta obarvena Phalloidinem FITC (první snímek), buněčná jádra obarvena propidium jodidem (druhý snímek), snímky složeny v programu Photoshop, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - Petriho miska (1. den), B - Petriho miska (3. den) .....	52

<b>Obr. 27:</b> Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena DAPI, (snímky složeny v programu Photoshop), tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL (1. den), B - PCL (3. den), C - PCL (7. den).....	52
<b>Obr. 28:</b> Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 10 µm: XeDerma® (0 hod., 24 hod., 48., 72. hod.) .....	54
<b>Obr. 29:</b> Snímky uměle vytvořené rány prostřednictvím inzertů, buněčná jádra obarvena propidium jodidem, snímky složeny v programu Photoshop, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL (0 hod.), B - (24 hod.), C - (48 hod.), D - (72 hod.).....	54
<b>Obr. 30:</b> Snímky SEM materiálů PCL z NC, měřítko odpovídá 10 µm - materiál PCL, testovací dny (1. den, 10. den) .....	56
<b>Obr. 31:</b> Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených DAPI, měřítko odpovídá 100 µm - řádky: materiál (PCL, XeDerma®), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den).....	62
<b>Obr. 32:</b> Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 100 µm - řádky: materiál (PCL, XeDerma®), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den) .....	62
<b>Obr. 33:</b> Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 100 µm - řádky: testovací dny (1. den, 3. den, 6. den, 10. den), sloupce: materiál (PCL, XeDerma® strana A, XeDerma® strana B) .....	64
<b>Obr. 34:</b> Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů obarvených propidium jodidem (snímky složeny v programu Photoshop), 10. den testování, tyto snímky byly nafoceny objektivem o zvětšení 4x: A - PCL, B - XeDerma® strana A, C - XeDerma® strana B .....	65
<b>Obr. 35:</b> Snímky SEM, měřítko odpovídá 50 µm - řádky: materiál (PCL, XeDerma® strana A, XeDerma® strana B), sloupce: testovací dny (3. den, 10. den) .....	66

## Seznam grafů

<b>Graf 1:</b> Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken PCL, 1. testovací den, NC .....	57
<b>Graf 2:</b> Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken PCL, 10. testovací den, NC.....	57
<b>Graf 3:</b> Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech .....	58
<b>Graf 4:</b> Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech. Hvězdičky zobrazují statisticky významnou odlišnost naměřených absorbancí 3. a 14. den ( $p < 0,05$ ).....	60
<b>Graf 5:</b> Hodnoty absorbance v závislosti na testovacích dnech .....	60